



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Procesos de remediación y recuperación de metales pesados
utilizando comunidades microbianas extremófilas***

Tesista: Francisco Luis Massello

Director/a: Edgardo Donati

Año: 2022

Procesos de remediación y recuperación de metales pesados utilizando comunidades microbianas extremófilas

Algunos metales pesados se han vuelto indispensables para la civilización y son omnipresentes en nuestras vidas cotidianas; debido a ello, se realizan numerosos esfuerzos para desarrollar nuevas tecnologías que permitan la extracción y producción de estos recursos en forma sostenible, al mismo tiempo que se analizan nuevas alternativas tecnológicas para la remediación de los ambientes ya contaminados. Los procesos biotecnológicos pueden sustituir a los tratamientos químicos tradicionales mediante la acción específica de consorcios, microorganismos y/o biomateriales. Las comunidades poli-extremófilas, presentes en ambientes con altas temperaturas, bajos valores de pH y/o altas concentraciones metálicas, resultan de interés para el desarrollo de procesos biotecnológicos que deban lidiar con metales pesados.

Precisamente, el objetivo central de este trabajo de tesis es la obtención de consorcios microbianos poli-extremófilos y resistentes a iones metálicos, bajo distintas condiciones metabólicas, para su uso en procesos biotecnológicos de recuperación y remediación de metales.

Para este estudio se utilizaron muestras procedentes de la región volcánica y geotermal de Caviahue-Copahue (Neuquén, Argentina). A partir de esas muestras, se obtuvieron consorcios microbianos con diferentes capacidades metabólicas que fueron caracterizados, en primera instancia, a través de metodologías cultivo-dependientes (Capítulo 2). Estos estudios permitieron comprobar que estos consorcios son altamente tolerantes a metales pesados, a pesar de que estos metales no estuvieron presentes en el ambiente al momento en que se tomaron las muestras. Posteriormente, los consorcios fueron sometidos a estudios genómicos y metagenómicos cultivo-independientes (Capítulo 3) para conocer los mecanismos de resistencia prevalentes en los consorcios y la composición microbiana de los mismos. Se analizaron los efectos de la exposición a metales sobre los perfiles microbianos y se evaluó un modelo que explicara las

diferencias observadas en la composición. Estos estudios revelaron la prevalencia de los mecanismos de resistencia basados en bombas de eflujo y, sustentado en observaciones previas, la adaptabilidad y versatilidad de los microorganismos nativos de la comunidad de la región.

Las cualidades de tolerancia y resistencia justificaron la evaluación del uso de estos consorcios microbianos en procesos de biorremediación y biorrecuperación de metales (Capítulo 4). Dentro de las aplicaciones estudiadas, se incluyó un proceso biohidrometalúrgico (biolixiviación de cobre a partir de un mineral sulfurado utilizando un consorcio acidófilo), un proceso de biosorción (adsorción de zinc y cadmio sobre biomasas y/o biopolímeros de ciertos aislados) y un proceso de bioprecipitación (inmovilización de diversos iones metálicos a partir de soluciones acuosas, de drenajes ácidos de minas y de licores de biolixiviación utilizando un consorcio sulfato-reductor).

La utilización de los consorcios obtenidos en este trabajo de tesis en los procesos biotecnológicos mencionados mostró resultados alentadores y un potencial prometedor que estimula la profundización de estos estudios para aplicaciones comerciales y/o a nivel de campo en el futuro próximo.

El presente trabajo de tesis es presentado para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas y fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



Reconocimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme abierto sus puertas – siempre abiertas –, primero, para formarme como Licenciado y, ahora, por permitirme optar por el título de Doctor.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación Argentina por haber financiado este trabajo y posibilitado su realización.

Al Ministerio de Salud y a todo el Personal de Salud de la Nación porque en medio de este trabajo de tesis irrumpió una pandemia. Porque sin el trabajo incansable, el compromiso y la voluntad de cada una de las personas involucradas este trabajo nunca hubiera podido ser completado.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y a todas las personas que lo construyen por constituir el espacio físico y cotidiano en que la totalidad de este trabajo fue llevada a cabo. Especialmente, al Laboratorio de Biorremediación y Biominería (678) y a Cecilia Bernardelli por haberme acompañado desde el primer día de mi formación.

Al Dr. Edgardo Donati por haber confiado y creído en mis capacidades y por darme la libertad para que forme y desarrolle mi propio *espíritu científico*. Por su dirección, su guía y sus nociones que lograron que este trabajo alcance sus objetivos.

Prefacio

En algún lugar de la Biblioteca de Babel esta tesis ya está escrita. Pero, por mucho que los caracteres se repitan idénticos posición por posición, no serán iguales; como no son iguales el Quijote de Cervantes y el Quijote de Pierre Menard. Y no serán iguales porque para escribir esta tesis, antes hube de atravesar un laberinto.

Hacer ciencia, producir conocimiento científico, se me parece mucho a recorrer un laberinto. Tomar decisiones es, la mayor parte de las veces, recorrer caminos que no conducen a ninguna parte. Caminos equivocados que no tienen otra forma de revelarse sino es recorriéndolos. Para atravesar un laberinto hay que caminar y hay que errar. No hay trucos. La ciencia es igual. Famosa es la frase que dice que la ciencia se construye progresivamente «*sobre hombros de gigantes*», más bien a mí me suena que la ciencia se acumula sobre una pila de errores (rectificados o no). Y no por capricho elijo el verbo *acumular*, el conocimiento se acumula, darle un significado, un sentido (eso que llamamos *desarrollo* o *progreso*) es otra cuestión: una decisión. En palabras de Oscar Varsavsky «*No se trata de explicar el mundo, sino de construir otro que nos guste más, y todo acto constructivo empieza por una decisión: vamos a hacer tal cosa de tal manera, entre todas las cosas posibles y todas las maneras posibles de hacerlas*». Pero el debate de qué y para qué se produce (y acumula) el conocimiento quedará para otra ocasión.

Podría hacer de este prefacio una *Oda al Error*, al fin y al cabo, si algo he aprendido en estos seis años es a fracasar, a equivocarme y a errar. A convivir con y a sobreponerme al error. Eso es el laberinto. Y es lo que subyace entre los caracteres y las páginas de esta tesis; más allá de lo lingüístico hay una historia que no se discute en métodos y resultados. Aunque así se aparezca, la ciencia no es una función de estado: **el recorrido significa**. Cada experiencia, cada verbo contiene una historia, y detrás de cada sujeto pasivo hay muchas personas. Porque debo decir que nunca hubiera recorrido este laberinto en soledad.

En la mitología griega, Teseo va a Creta a matar al Minotauro y a salvar al pueblo ateniense (condenado a mandar jóvenes como tributo para alimentar a la bestia). Para lograr la hazaña, Ariadna le entrega a Teseo un ovillo de hilo y una espada: la espada era para matar al Minotauro, el ovillo era para desenrollarlo a medida que se adentraba en el laberinto, de forma de poder salir sin perderse recogéndolo. Me gustaría decir que en mi aventura hubo muchas Ariadna que me guiaron cuando estuve perdido y sin cuya ayuda jamás podría estar escribiendo esto. Y también hubo muchos Egeo que, como el padre de Teseo, creyeron en mí, me alentaron y esperaron ansiosos que regrese con banderas triunfales. Y hubo quienes interpretaron ambos roles. El mito griego termina muy mal porque Teseo abandona a Ariadna en una isla y Egeo se suicida pensando que su hijo fracasó; pero, vamos, tampoco yo salvé al pueblo de Atenas.

El laberinto hace que esta tesis sea más que el conocimiento científico que presenta: **lo que he aprendido va más allá de mis conocimientos**. En el pensamiento posmoderno, la relación entre el sujeto que conoce y el objeto que es conocido no es lineal ni, mucho menos, sujetocentrista; el acto de conocer afecta tanto al sujeto como al objeto. (Y podría encontrar acá una relación con el Principio de Incertidumbre de Heisenberg y el famoso experimento de la doble rendija). El sujeto define al objeto y en eso se define, también, a sí mismo. Martin Heidegger dirá que lo que está entre el sujeto y el objeto durante la producción de conocimiento es *el ser*. Parfraseándolo, diré que en medio del doctorando Francisco L. Massello y la tesis «*Procesos de remediación y recuperación de metales pesados utilizando comunidades microbianas extremófilas*» está el laberinto y estoy yo. Ahí radica la diferencia entre estas 400 páginas y las 400 páginas idénticas que reposan en algún hexágono de la Biblioteca de Babel. Y es que esta tesis será también, de alguna forma más humana, un *horrocrux*.

*Ale, Monse, Ger, Cami, Mica,
Gracias por estar.*

*A quienes creen, construyen y luchan
por una educación
pública, gratuita, inclusiva y de calidad.*

*Y a quienes trabajan incansablemente
con la convicción de que un desarrollo
social y ambientalmente sostenible
es posible.*

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
<i>Introducción general</i>	<i>1</i>
1.1. Resumen	2
1.2. Los metales y la civilización contemporánea	3
1.3. Toxicidad de los metales y dispersión en el ambiente	7
1.4. Biotecnologías de recuperación y remediación de metales	11
1.5. Ecología microbiana, herramientas genómicas y metagenómicas.....	31
1.6. Los microorganismos y las comunidades microbianas extremófilas	37
1.7. El sistema Caviahue-Copahue.....	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
HIPÓTESIS.....	51
OBJETIVOS.....	52
CAPÍTULO II.....	53
<i>Microorganismos del sistema geotermal Caviahue-Copahue: Caracterización y tolerancia a metales pesados.....</i>	<i>53</i>
2.1. INTRODUCCIÓN	54
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.3. RESULTADOS	71
2.4. DISCUSIÓN	97
2.5. CONCLUSIONES.....	109
CAPÍTULO III.....	111
<i>Análisis molecular de los consorcios microbianos.....</i>	<i>111</i>
3.1. INTRODUCCIÓN	112
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	114
3.3. RESULTADOS	131
3.4. DISCUSIÓN	171
3.5. CONCLUSIONES.....	194

CAPÍTULO IV 198

Potencial biotecnológico de los consorcios obtenidos: biorremediación y biolixiviación de metales pesados..... 198

4.1. INTRODUCCIÓN 199

4.2. Biolixiviación de mineral de cobre 201

4.3. Procesos de biorremediación: selección de consorcios..... 210

4.4. Procesos de biorremediación: aislamiento de microorganismos 214

4.5. Procesos de biorremediación: biosorción de cadmio y zinc con células enteras 221

4.6. Procesos de biorremediación: biosorción de cadmio y zinc con exopolímeros 228

4.7. Procesos de biorremediación: sulfidogénesis 239

4.8. Procesos de biorremediación: bioprecipitación de cobalto utilizando bacterias sulfato-reductoras..... 253

4.8. Procesos de biorremediación: bioprecipitación de metales de un drenaje ácido 260

4.9. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado con soluciones sulfuradas biogeneradas 270

4.10. Procesos de biorremediación: diseño de un sistema de precipitación de cationes por H₂S biogenerado 276

4.11. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado por H₂S biogenerado..... 282

4.12. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado por soluciones sulfuradas y H₂S biogenerados..... 285

CAPÍTULO V..... 290

Conclusiones generales y perspectivas..... 290

5.1. CONCLUSIONES GENERALES..... 291

5.2. PERSPECTIVAS..... 294

5.3. COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES 297

BIBLIOGRAFÍA..... 299

ANEXO I..... 331

Determinaciones analíticas 331

Espectroscopía de absorción atómica.....332

Permanganometría334

Determinación de Fe(II) por el método colorimétrico de la o-fenantrolina336

Recuento celular338

Determinación de sulfato por precipitación con BaCl₂.....340

ANEXO II 345

*Recopilación bibliográfica de concentraciones inhibitorias mínimas de los metales
estudiados..... 345*

ANEXO III..... 359

Cinéticas de crecimiento..... 359

Consortios organótrofos aeróbicos360

Consortios litótrofos (acidófilos)374



CAPÍTULO I

Introducción general



1.1. Resumen

Desde la antigüedad la humanidad ha hecho uso de los metales en múltiples y diversas funciones (armamentos, herramientas de trabajo, utensilios domésticos, construcciones, etc.). Sin embargo, el advenimiento de la revolución industrial en el siglo XVIII hizo que los metales pasaran a cumplir un rol imprescindible en la *nueva civilización*. En consecuencia, la edad moderna se puede caracterizar por la creciente demanda y explotación de los recursos naturales bajo una filosofía lineal de la economía y la producción. La filosofía lineal sumada al desconocimiento, las malas prácticas y la falta de regulación legal derivaron en la dispersión a gran escala de compuestos tóxicos en el ambiente, especialmente, en suelos y ríos, pero también en la atmósfera. Dos siglos y medio bajo estas prácticas han puesto *en jaque*, no sólo a los ecosistemas naturales, sino a la salud y la calidad de vida de los seres humanos. De esta manera, la posmodernidad se presenta con el desafío insoslayable de discutir nuevas filosofías económico-productivas y de desarrollar tecnologías ambientalmente sostenibles que permitan la extracción, producción y recuperación de recursos, pero también, nuevas tecnologías para la remediación de los ambientes contaminados durante la era pasada. En este contexto, las biotecnologías se presentan como posibles ejes fundamentales de *la nueva era*. Algunas posibilidades ofrecidas por las biotecnologías son el tratamiento de efluentes residenciales e industriales utilizando biomasas, la extracción y recuperación de metales a través de procesos *biomineros*, la biorremediación de suelos y vertederos contaminados por industria agroquímica y petrolífera, la producción de biocombustibles a partir de fuentes renovables, entre otros tantos desarrollos de potencial real y de interés creciente.

1.2. Los metales y la civilización contemporánea

Los metales son aquellos elementos químicos que se caracterizan por ser buenos conductores, brillantes, maleables y dúctiles (Jones & Atkins, 2001). Los *metales pesados*, en cambio, son un grupo de elementos menos definido que se caracterizan por presentar alta densidad (mayor a 4-6 g/cm³), peso atómico elevado (mayor a 23-40) y toxicidad considerable (al menos alguna/s de la/s especie/s derivada/s) (Duffus, 2002). Dentro del grupo de los metales pesados se encuentran metales como cobre, zinc, cadmio, níquel, cobalto, mercurio, plomo y cromo, pero también metaloides como arsénico y selenio, entre otros (Scott & Smith, 1981).

Dada sus características, los metales y, en particular, los metales pesados ofrecen una enorme variedad de aplicaciones y están presentes en prácticamente todos los aspectos de la vida contemporánea. Sus usos abarcan las construcciones basadas en acero y aluminio, el tendido eléctrico, los componentes electrónicos de todos los dispositivos de uso diario (televisores, radios, celulares, computadoras), los equipos de laboratorio y diagnóstico, los medios de transporte y maquinarias (motores, carrocerías, rieles de ferrocarril), los instrumentos musicales, utensilios domésticos, productos medicinales y las mismas herramientas con que se construyen los productos antes mencionados.

El uso extendido de los metales se traduce en una enorme demanda que crece muy por encima del aumento de la población mundial. A principios del siglo XX, la producción mundial de metales por actividad minera era de 100 millones de toneladas por año (los valores citados corresponden al Servicio Geológico de los Estados Unidos¹); hacia principios de la década de 1980, la producción había alcanzado los 1000 millones de toneladas al año, cifra que se duplicó en las dos décadas posteriores. Así, en 2010, la producción global ya había superado los 3000 millones de toneladas al año (**Figura 1.1**). Una variedad

¹ U.S. Geological Survey (USGS), Mineral Commodity Summaries. (<https://www.usgs.gov/centers/national-minerals-information-center/commodity-statistics-and-information>) (Enero 2022)

de circunstancias económicas, mayormente desencadenadas por un cambio en la filosofía geopolítica de la República Popular China y la crisis financiera de 2008, generaron incertidumbre en el mercado metalífero y los precios se volvieron inestables ocasionando que la producción mundial de metales cayera y luego se mantuviera en el mismo orden durante la última década entre 2010 y 2020.

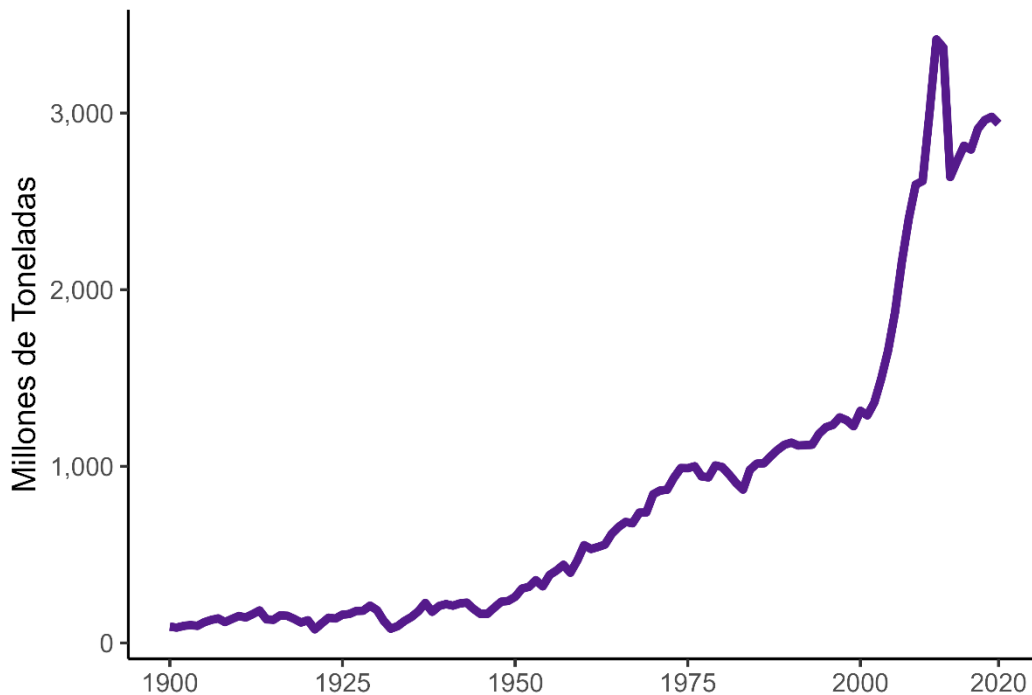


Figura 1.1 – Producción mundial metalífera anual desde principios de siglo XX (estimación a partir de los informes de producción de las commodities más significativas: aluminio, cobre, hierro, plomo, manganeso, níquel, plata, estaño, tungsteno, zinc y oro).

En los últimos años, las nuevas tecnologías electrónicas han desencadenado un incremento en el consumo y, consecuentemente, en la demanda de las llamadas *tierras raras* y de metales no tradicionales (litio, cobalto, estaño, antimonio y molibdeno, principalmente) (Dushyantha *et al.*, 2020; Kalantzakos, 2020; Girtan *et al.*, 2021). En el caso del litio, por ejemplo, su producción anual se incrementó desde 6000 t en 1994 a 90 000 t en 2019; del mismo modo, la producción anual de cobalto aumentó desde 18 000 t en 1994 a 140 000 t en 2020.

En Argentina, la actividad minera metalífera es muy inferior a la esperable en función de sus reservas (EITI, 2021). La **Figura 1.2** muestra la producción metalífera durante las últimas tres décadas (Fuente de los datos nacionales: Secretaria de Minería²). Aunque a lo largo de este período la producción de hierro y cobre supera largamente al resto, en la actualidad no existen operaciones mineras importantes para explotar ninguno de ellos.

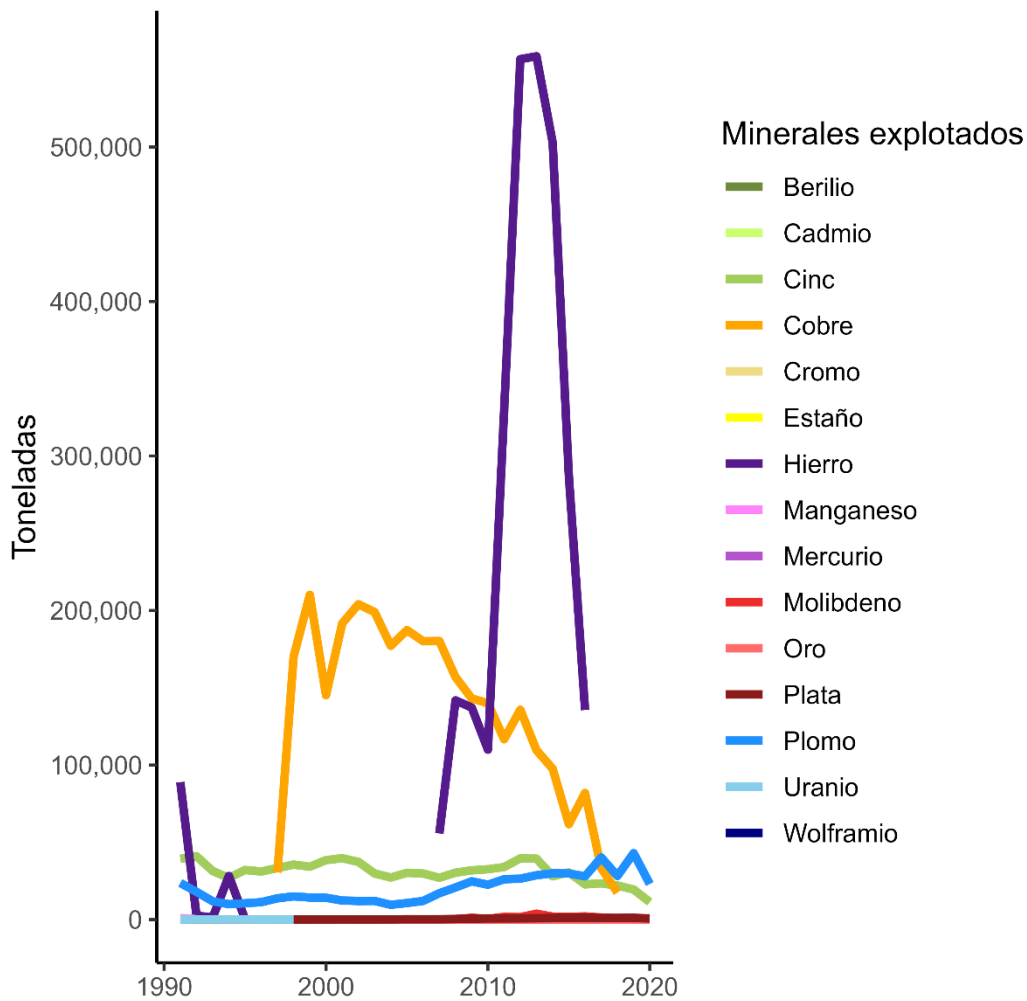


Figura 1.2 – Producción metalífera anual de Argentina desde 1990. Se listan todos los metales explotados en el tiempo establecido.

² Sistema Federal de Información Minera, Secretaria de Minería, Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación (<http://informacionminera.produccion.gob.ar/>) (Enero 2022)

En el año 2020, se explotaron cinco metales en Argentina: plomo (23 000 t), zinc (11 320 t), plata (767 t), cadmio (46 t) y oro (35 t), en un total de doce plantas. En consideración del contexto global mencionado antes, debe referirse que Argentina presenta la tercer mayor reserva de litio del mundo (junto con Chile y Bolivia), debido a ello, la producción de litio es la que exhibió mayor aumento en las últimas décadas, pasando de 1000 t en 2001 a un total de 34 067 t de carbonato de litio en 2019 (representando 7,4% de la producción mundial).

1.3. Toxicidad de los metales y dispersión en el ambiente

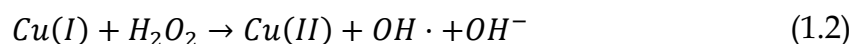
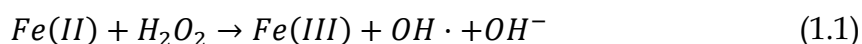
Si bien los metales son pilares fundamentales de la civilización contemporánea y, muchos de ellos, son nutrientes esenciales para la vida (actuando como cofactores de enzimas y como agentes oxidantes/reductores para la homeostasis), en concentraciones no muy elevadas presentan una gran toxicidad y pueden resultar letales para el ser humano y otras formas de vida.

Una de las causas de la toxicidad de los metales es la inhibición y/o pérdida de funcionalidad de algunas enzimas por la interacción de los cationes metálicos con los grupos tiol de algunos aminoácidos (SH de la cisteína y SCH₃ de la metionina). Los metales generan efectos cancerígenos cuando afectan la función de proteínas de señal y/o reguladoras de apoptosis, de división y/o crecimiento, o vinculadas a la reparación del ADN y/o de su metilación. Por ejemplo, la proteína p53 regula un *checkpoint* del ciclo de división celular y su alteración ocasiona el crecimiento descontrolado de las células generando riesgo de cáncer, algunos metales pesados afectan proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales de p53 (como NF-κB y AP-1, que individualmente también intervienen en la regulación crecimiento/apoptosis) y, en consecuencia, pueden descontrolar el crecimiento celular (Trully *et al.*, 2000; Tchounwou *et al.*, 2012; Azeh Engwa *et al.*, 2019).

Otro mecanismo de toxicidad de los metales, y quizás el más importante, es el estrés oxidativo por la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS incluyen al anión superóxido (O₂⁻), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (OH·), estas especies son altamente reactivas y presentan un elevado poder oxidante. Estas especies son normalmente producidas como intermediarios durante el metabolismo aeróbico, pero son mantenidas en concentraciones muy bajas por la célula, reguladas estrictamente a través de la acción de enzimas y compuestos antioxidantes que previenen que las ROS causen daños irreversibles a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las ROS cumplen un rol esencial en la homeostasis como señales del estado redox e interviniendo en la activación de diversos factores de

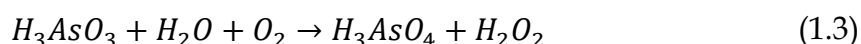
transcripción vinculados al ciclo celular. Por ello, un desbalance en la concentración de ROS (por aumento de especies oxidantes o por disminución de antioxidantes) puede desencadenar tanto la apoptosis como el crecimiento descontrolado (células cancerígenas) (Cabiscol *et al.*, 2000; Apel & Hirt, 2004; Schieber & Chandel, 2014).

La vía a través de la cual los metales pesados incrementan la concentración de ROS depende de cada caso particular (Valko *et al.*, 2005). Por ejemplo, el hierro, el cobre y, posiblemente, también el cobalto, en sus especies más abundantes dentro de la célula (Fe(II), Cu(I) y Co(I)), generan radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton (**ecuaciones 1.1 y 1.2**):



El radical hidroxilo es el más reactivo de las ROS y, además de atacar proteínas y ADN, puede reaccionar con fosfolípidos degradando la membrana celular en un proceso llamado peroxidación lipídica.

El arsénico genera ROS a través de vías más complejas y aún no completamente esclarecidas. Se ha propuesto la generación de peróxido durante la reacción oxidativa del arsenito (**ecuación 1.3**):



El peróxido puede descomponerse posteriormente, generando radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton con moléculas de cobre o hierro intracelular (**ecuaciones 1.1 y 1.2**). Además, durante la reacción de oxidación del arsenito se generan ciertos intermediarios reactivos como $[(CH_3)_2AsOO \cdot]$ y $[(CH_3)_2As \cdot]$ (Bonetto *et al.*, 2014).

Por su parte, el níquel, el cadmio y el mercurio no producen ROS de manera directa, sino afectando su regulación, por ejemplo, a través de la inhibición de las enzimas antioxidantes (la superóxido dismutasa, entre otras) o la reacción con los compuestos buffer del potencial redox (como el glutatión).

Esta discusión muestra que la toxicidad de los metales para todas las formas de vida reside, fundamentalmente, en la capacidad de afectar la homeostasis de la célula a varios niveles, pero, principalmente, en la regulación del crecimiento, proliferación y muerte, convirtiéndolos así en compuestos cancerígenos.

La toxicidad de los metales sumada a que, a diferencia de los compuestos orgánicos, no pueden ser degradados y permanecen inalterados en el medio ambiente (van Gestel, 2008) exige el máximo esfuerzo para evitar su dispersión ambiental y/o su concentración en suelos, aguas y aire.

Los procesos extractivos, de almacenamiento y de descarte cuando se acaba la vida útil de los materiales o dispositivos que integran constituyen el máximo riesgo de dispersión y, consecuentemente, de impacto ambiental.

En el primer caso, las operaciones mineras a nivel industrial que cesan sus actividades sin un cierre adecuado dejan instalaciones y residuos dispersos e incorrectamente almacenados (constituyendo un tipo de pasivo ambiental denominado *pasivo ambiental minero*). Estos pasivos pueden tener un fuerte impacto ambiental, especialmente a través de la generación de drenaje ácido de mina (DAM). Los DAM se generan cuando las rocas sulfuradas acumuladas en escombreras y diques de cola quedan expuestas a oxígeno y agua (Johnson, 2003; Johnson & Hallberg, 2005; Akcil & Koldas, 2006). En estas condiciones, se produce la oxidación de los sulfuros; algunos de ellos, como la piritita, generan acidez al oxidarse. Los microorganismos hierro-oxidantes (que pueden aprovecharse en biotecnologías dirigidas a la recuperación de metales como se discutirá en la sección siguiente) pueden acelerar estos procesos de oxidación generando un oxidante como el ion hierro(III) de manera cíclica. Este medio oxidante y ácido puede atacar otras especies minerales, incluyendo otros sulfuros metálicos, desencadenando la liberación de estos cationes y, también, de sulfato. El DAM, así constituido, puede dispersarse afectando cursos de agua superficiales y subterráneos y afectando gravemente los ecosistemas circundantes.

Recientemente, el *boom* de los productos electrónicos de corta vida útil ha ocasionado que enormes cantidades de desechos metálicos sean generados diariamente en forma de dispositivos, *hardwares* y baterías (descritos por el neologismo *e-wastes*) que se descartan y acumulan en basurales urbanos (Tansel, 2017). Por otro lado, las industrias utilizan cotidianamente enormes cantidades de metales en catalizadores, procesos de galvanizado, reacciones redox, pigmentación, entre otros; estos metales son frecuentemente desechados en los efluentes que se dispersan ambientalmente.

Estas razones obligan a planificar las tareas de extracción de metales utilizando nuevas tecnologías con un bajo impacto ambiental. Simultáneamente, es necesaria una revisión cuidadosa de la cadena de producción y de los procesos de generación de materiales y dispositivos con contenido metálico con el objetivo de reducir su uso y prevenir su dispersión. Del mismo modo, es indispensable el control –estatal y social– de las distintas formas de dispersión en el medio ambiente, tanto por las emisiones de la cadena productiva como por el descarte final de dispositivos y materiales. Finalmente, es necesario avanzar con celeridad hacia la mitigación y remediación de los lugares ya alcanzados por la contaminación con metales significando un daño, muchas veces, irreversible a los ecosistemas y, en algunos casos, a los seres humanos que viven en sus cercanías.

1.4. Biotecnologías de recuperación y remediación de metales

Algunas biotecnologías se proponen enfrentar el problema de la dispersión y contaminación con metales ofreciendo alternativas de menor impacto ecológico tanto para la extracción (procesos de *biorrecuperación* y *biominería*), como para el tratamiento de los sitios ya contaminados (procesos de *biorremediación*). A continuación, describiremos algunas de estas biotecnologías.

La **Figura 1.3** representa esquemáticamente la minería metalífera tradicional. Brevemente –aunque existen variantes–, el proceso de explotación de un mineral comienza en el yacimiento, a cielo abierto o subterráneo. La primera etapa es la remoción de rocas estériles (sin contenido importante del metal de interés) que se acumulan en zonas aledañas formando las escombreras. Luego, durante la explotación minera, el mineral extraído se somete a diferentes tratamientos como el chancado, la molienda y la flotación. Los residuos de esta etapa suelen ser lodos o una mezcla líquida de materiales finos que se almacenan en los denominados diques de cola (*tailings*). Los concentrados mineros, dentro de los cuales se encuentra el metal de interés, son sometidos a diferentes técnicas metalúrgicas para lograr la extracción del catión metálico. Estas técnicas metalúrgicas se agrupan en las térmicas (pirometalurgias), que someten al mineral a temperaturas superiores a 900-1000 °C, y las que utilizan extracciones acuosas (hidrometalurgias).

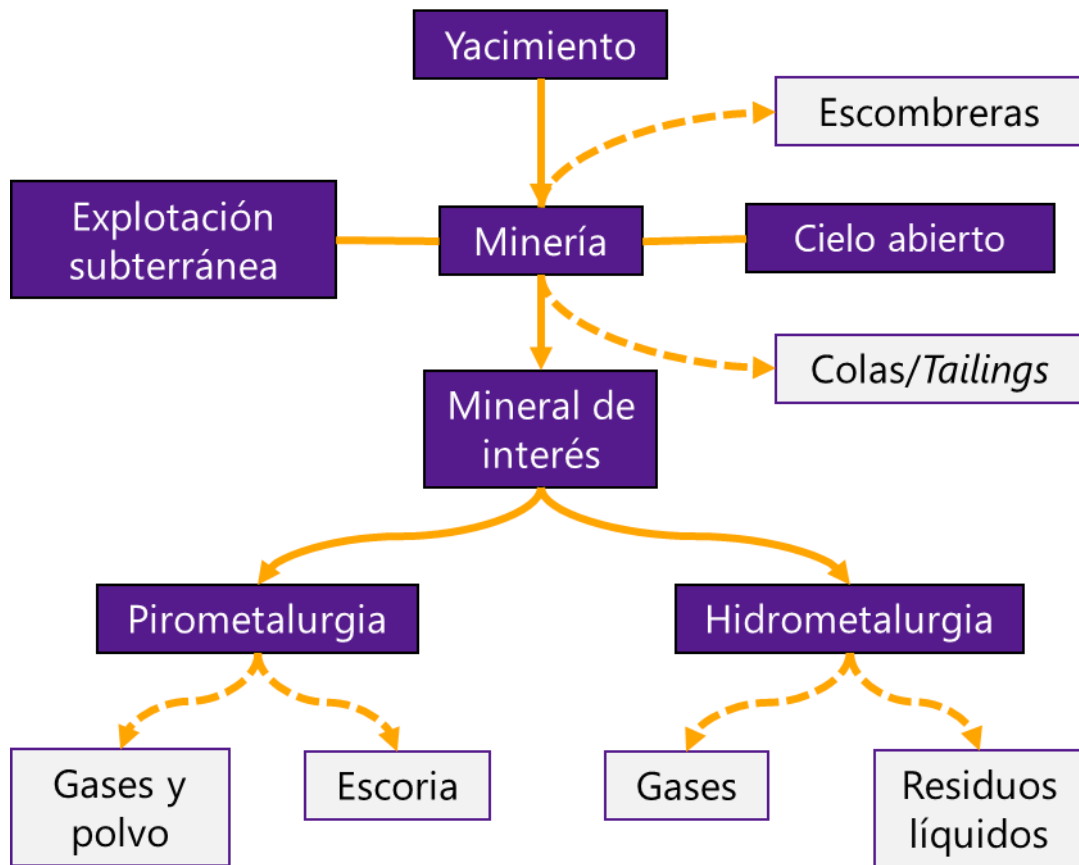
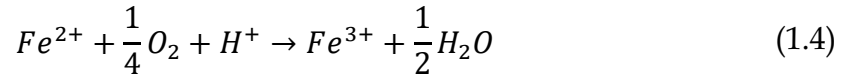


Figura 1.3 – Esquema de las primeras etapas de la minería metalífera tradicional utilizando metalurgias e incluyendo los productos de desecho generados (líneas cortadas y cuadros grises).

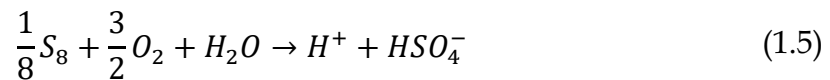
Estos procesos extractivos suelen tener un fuerte impacto sobre el medio ambiente. Las pirometalurgias consumen grandes cantidades de energía y generan gases con evidente, aunque variable, capacidad de impacto (SO_2 , NO , NO_2 , CO_2 , CO). En el caso de la hidrometalurgia, el principal riesgo es la filtración de soluciones concentradas de ácidos, bases, cianuros y otros compuestos químicos que se utilizan en las extracciones o, también, de las soluciones lixiviadas que contienen altas concentraciones de metales y metaloides como el arsénico.

Una rama de importante crecimiento de la hidrometalurgia es la *biohidrometalurgia*, la cual engloba técnicas biotecnológicas que aprovechan la capacidad de ciertos microorganismos para mejorar alguna etapa del procedimiento extractivo. La *biominería* –como suele denominarse a la biohidrometalurgia– tiene como proceso dominante la *biolixiviación*, que es la

solubilización de minerales sulfurados, usualmente de muy baja solubilidad, utilizando microorganismos litotróficos (Donati & Sand, 2007; Schippers *et al.*, 2013, Johnson, 2013). La actividad metabólica más relevante de los microorganismos que participan en la biolixiviación es la catálisis de la oxidación de hierro(II) (**ecuación 1.4**), por ello, la mayoría de los microorganismos *biolixiviantes* son litótrofos hierro-oxidantes.



Los microorganismos hierro-oxidantes suelen estar acompañados de microorganismos azufre-oxidantes que catalizan la oxidación de compuestos reducidos de azufre, ciertos microorganismos son capaces de realizar ambos procesos metabólicos. En la ecuación siguiente (**ec. 1.5**), se ejemplifica el proceso para la oxidación de azufre elemental (S_8):



Los procesos anteriores muestran la generación de medios ácidos y oxidantes los cuales favorecen la solubilización de los sulfuros metálicos.

La **Figura 1.4** representa la biolixiviación de un mineral MS donde M es un metal divalente. En ella se muestra el rol principal de los microorganismos biolixiviantes: reciclar en forma sostenida el hierro férrico y, eventualmente, generar ácido a partir de las especies sulfuradas (crS) que se producen durante el *ataque ácido/oxidante* sobre el mineral; como resultado, se libera a la solución el catión metálico (M^{2+}).

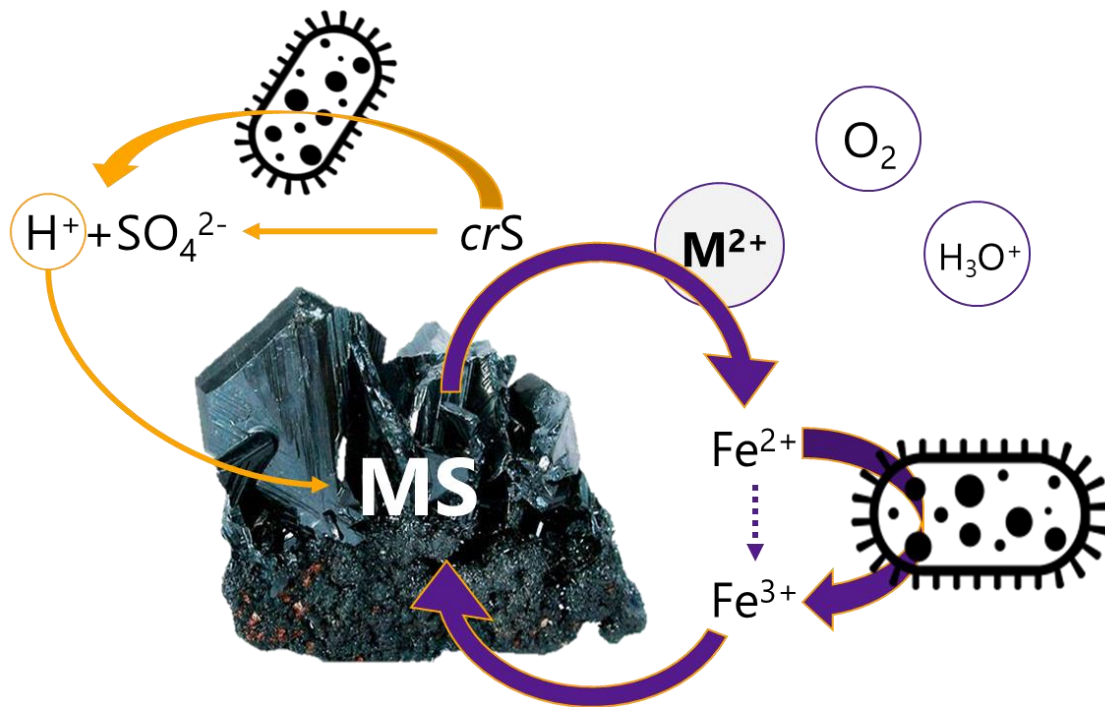
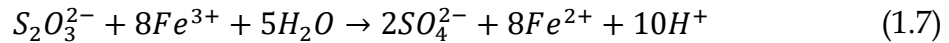
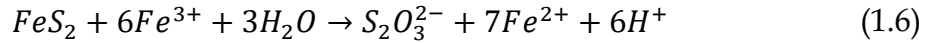


Figura 1.4 - Esquema del mecanismo de biolixiviación de un mineral sulfurado (MS) en una solución ácida y en condiciones aeróbicas, en presencia de hierro con la liberación de compuestos reducidos de azufre (crS) y del catión metálico M²⁺.

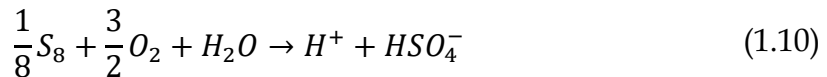
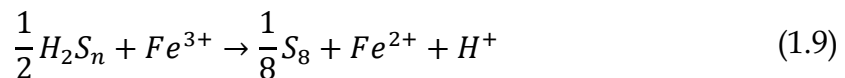
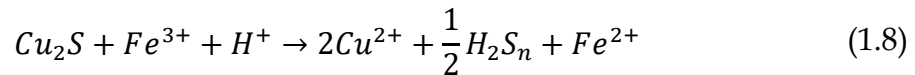
Todos los sulfuros metálicos pueden ser oxidados y, consecuentemente, solubilizados por acción del ion férrico; no obstante, no todos los sulfuros pueden ser solubilizados por acción ácida. Esto dependerá de la naturaleza del enlace azufre-metal, la cual puede interpretarse a través de la interacción entre los orbitales atómicos de valencia de los elementos involucrados. Debido a ello, se han propuesto dos mecanismos de biolixiviación de acuerdo con la mineralogía del compuesto: el mecanismo del tiosulfato, para sulfuros insolubles en medio ácido, y el mecanismo del polisulfuro, para minerales solubles en medio ácido (Schippers & Sand, 1999; Sand *et al.*, 2001).

En los minerales no solubles en medio ácido (FeS₂, MoS₂, WS₂), la acción del ion férrico genera tiosulfato (S₂O₃²⁻), el que posteriormente puede ser oxidado a tetratiónato (S₄O₆²⁻) y otros politionatos, siendo sulfato (SO₄²⁻) el producto final y protones el subproducto. Estos procesos (representados para el caso de la pirita (FeS₂) en las **ecuaciones 1.6** y **1.7**) se producen químicamente sin catálisis

microbiana; la intervención de los microorganismos recae en la generación permanente de ion férrico y, eventualmente, en la catálisis de la producción de protones (por oxidación de algunas fuentes reducidas de azufre). La primera garantiza la continuidad del ataque oxidante, mientras que la segunda facilita el mantenimiento de los cationes metálicos en solución (mayoritariamente más solubles en medio ácido).



El mecanismo del polisulfuro está resumido en las **ecuaciones 1.8-1.10** utilizando calcosina (Cu_2S) como ejemplo de un sulfuro soluble en medio ácido. En este caso, el azufre es liberado como polisulfuro (H_2S_n , $n \geq 2$) (**ec. 1.8**) por la acción, individual o conjunta, de iones férrico y protones, e inmediatamente oxidado por el hierro(III) a azufre elemental (S_8) (**ec. 1.9**). El azufre elemental es insoluble, pero puede ser oxidado por microorganismos azufre-oxidantes generando protones (**ec. 1.10**). De esta manera, los protones pueden reiniciar el ciclo contribuyendo, junto al ion férrico, a la disolución del sulfuro. En la vía del polisulfuro, consecuentemente, participan de un modo activo tanto microorganismos hierro-oxidantes como azufre-oxidantes.



Los microorganismos biolixiviantes, además de ser hierro-/azufre-oxidantes, poseen ciertas características necesarias para participar en estos procesos: afinidad/tolerancia por los medios ácidos y tolerancia/resistencia a concentraciones elevadas de metales y metaloides. Muchos de estos microorganismos son, además, autótrofos por lo cual no requieren la presencia (y, por ende, tampoco necesitan agregados) de fuentes orgánicas. En consecuencia, los microorganismos biolixiviantes son acidófilos

quimiolitautótrofos tolerantes (o resistentes) a metales. Este conjunto de características suele clasificarlos dentro del grupo *extremófilo*. Microorganismos con estas cualidades han sido aislados, principalmente, en ambientes relacionados a la actividad minera (escombreras, diques de cola y drenajes ácidos); pero también pueden encontrarse en ambientes extremos naturales de condiciones similares, como las regiones volcánicas y geotermales (Brock, 1978).

Los microorganismos biolixiviantes reportados corresponden tanto al dominio de las bacterias como al de las arqueas. Actualmente se conocen decenas de géneros y casi un centenar de especies que pueden ser clasificadas como biolixiviantes. Entre las bacterias, el género *Acidithiobacillus* es de los más estudiados. Dentro del género, la especie mesófila más relevante, probablemente, es *A. ferrooxidans* (la primera en ser aislada), un microorganismo hierro y azufre-oxidante; similar metabolismo presentan las especies *A. ferriphilus*, *A. ferrivorans* y *A. ferridurans*. Dentro de las especies azufre-oxidantes pertenecientes a este género se destacan *A. thiooxidans*, *A. albertensis* y *A. caldus*; las dos primeras son mesófilas, mientras que la última es un termófilo moderado (Nuñez *et al.*, 2017).

Otros géneros de bacterias biolixiviantes son *Leptospirillum* y *Sulfobacillus*; este último género, a diferencia de los otros mencionados, corresponde a microorganismos Gram-positivos con metabolismo mixótrofo, es decir, con la capacidad de obtener electrones de compuestos inorgánicos (como el hierro y el azufre) pero, también, de compuestos orgánicos (Justice *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

Dentro de las arqueas biolixiviantes, los géneros mejor estudiados son *Ferroplasma* y *Sulfolobus*. El primero es un género de gran interés evolutivo ya que presenta vías metabólicas ancestrales (Golyshina *et al.*, 2017), corresponde a microorganismos de gran versatilidad, mesófilos o mesotermófilos, anaerobios facultativos capaces de crecer en condiciones de acidez extrema a través de un metabolismo litótrofo u organótrofo; sus células carecen de pared celular por lo que son pleomorfos (Golyshina *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004; Golyshina & Timmis, 2005; Zhou *et al.*, 2008). *Sulfolobus*, en cambio, es un género de arqueas

anaerobias facultativas; la mayoría de las especies de este género son mixótrofas capaces de oxidar hierro y azufre, con la excepción de *S. metallicus* que es litótrofo estricto. La característica distintiva de *Sulfolobus* respecto a los géneros antes mencionados es que son microorganismos termófilos con temperaturas óptimas de crecimiento superiores a los 65°C (Brock *et al.*, 1972; Quehenberger *et al.*, 2017; Shocke *et al.*, 2019).

En la actualidad, existe una numerosa cantidad de proyectos mineros que utilizan la biohidrometalurgia en sus operaciones, siendo los más relevantes los que realizan la biooxidación de minerales de oro (una variante de la biolixiviación donde el material de interés queda concentrado en la matriz sólida) y la biolixiviación de minerales de cobre de baja ley (Schippers *et al.*, 2014). En estos casos, los menores costos y el menor impacto ambiental compensan los tiempos más largos que requieren estos procesos respecto a las metodologías de extracción tradicionales.

La biolixiviación (y, en menor medida, la biooxidación) utilizan a escala industrial el sistema de *pilas de lixiviación* (**Figura 1.5**). En este sistema, el material extraído triturado (pero no molido), es apilado sobre una membrana impermeable formando pilas de hasta 4000 m de largo y 18 m de alto. Las pilas son regadas con una solución acuosa ácida y, en algunos sistemas se utilizan, además, aireadores que inyectan oxígeno desde la base. En la mayoría de los casos se utilizan los microorganismos autóctonos presentes en el mineral, mientras que en algunas otras ocasiones se inoculan microorganismos previamente cultivados. En el seno de la pila, la mezcla de agua y oxígeno activa el metabolismo de los microorganismos litótrofos generando la biolixiviación. El lixiviado, en el cual se concentra el metal de interés, es recuperado directamente desde la base de la pila, enviado para la extracción del metal y vuelto a reciclar para continuar con el regado de la pila.



Figura 1.5 – Esquema de una pila de biolixiviación. (Figura modificada de Petersen (2016)).

En la recuperación de metales de alto valor en el mercado y/o cuando se tratan concentrados de alta ley, es posible utilizar la tecnología de los biorreactores para la recuperación de los metales. En este caso, se trata de grandes tanques que trabajan en continuo y que se alimentan con mineral finamente molido para poder ser mantenidos en suspensión a través de la aireación. Estos tanques suelen ser inoculados externamente con consorcios de microorganismos mesófilos o, incluso, con termófilos moderados que aceleran notablemente el proceso. Los termófilos e hipertermófilos, en cambio, aún no se usan a nivel comercial ya que, entre otros requerimientos, obligan al uso de tanques contruidos con materiales capaces de resistir las condiciones corrosivas en las que estos microorganismos se desarrollan adecuadamente (altas temperaturas, bajos valores de pH, altos potenciales redox). Estos sistemas, con tiempos de residencia de 6-12 días, se utilizan a nivel comercial sólo para la biooxidación de minerales de oro (con el objetivo de reducir su carácter refractario antes de proceder a la cianuración), y para la recuperación de cobalto a partir de la biolixiviación de minerales sulfurados que contienen dicho metal.

La biominería puede ser utilizada para la recuperación de diversos metales a partir de minerales, pero hasta el momento sólo se ha alcanzado la aplicación comercial parcial para cobre, oro, cobalto y uranio, existiendo emprendimientos con tanques agitados o con pilas en varios países del mundo, especialmente para los dos primeros casos. También se han logrado promisorios resultados a nivel de escala piloto para níquel y zinc, entre otros. En América del

Sur existen experiencias concretas de biominería para la recuperación de cobre, oro y uranio, en Chile, Perú y Brasil, respectivamente. Chile es el mayor productor de cobre del mundo y es pionero en el uso de esta biotecnología, contando con las primeras aplicaciones comerciales a nivel de pilas en la década de 1980; en la actualidad, aproximadamente el 20% de su producción se realiza a través de procesos de biolixiviación. La Escondida, Spence y Zaldívar son algunas de las explotaciones mineras más importantes que hacen uso de esta biotecnología (Rawlings & Johnson, 2007; Gentina & Acevedo, 2013).

Argentina, a pesar de sus enormes reservas de oro y cobre, tiene una bajísima producción de ambos metales, como se ha mencionado previamente. Hasta el momento, ninguna de las explotaciones mineras activas utiliza (ni se ha utilizado previamente) procesos biomineros.

Aunque la biominería es una tecnología promisoriosa y con menor impacto ambiental, está lejos de haberse impuesto sobre las tecnologías tradicionales, aún para metales como el oro y el cobre. El principal inconveniente es que requieren tiempos significativamente mayores en comparación a otras tecnologías. Un variable que podría reducir estos tiempos es el incremento de la interfase mineral-medio-microorganismo; sin embargo, esta está limitada por los altos costos de la molienda. Un segundo inconveniente de la biominería es la baja flexibilidad de los microorganismos biolixiviantes frente a eventuales cambios en las condiciones y/o a la presencia circunstancial de especies inhibitorias del metabolismo microbiano.

En consecuencia, los esfuerzos actuales están dirigidos a aumentar la cinética de los procesos y a buscar una acción microbiana más *robusta*. La búsqueda de nuevas cepas, más rápidas y/o más resistentes a posibles inhibidores, es un camino bastante limitado. Por ejemplo, los microorganismos termófilos presentan cinéticas más rápidas, pero no sólo obligan a materiales más resistentes (y, por ende, más costosos), sino que, además, suelen ser menos resistentes y flexibles a cambios en las condiciones. Una alternativa interesante es el uso de consorcios contruidos artificialmente a partir de la combinación de

distintas especies, o el uso de consorcios obtenidos directamente a partir de comunidades naturales.

Además de su utilización para la recuperación de metales a partir de los minerales que los contienen, la biolixiviación se utiliza para la recuperación de metales a partir de matrices sólidas como residuos, lodos y materiales descartados. Una gran cantidad de estudios recientes han avanzado sobre las posibles aplicaciones de los microorganismos biolixiviantes en la recuperación de metales a partir de productos electrónicos descartados como *e-wastes* (Rasoulnia *et al.*, 2020; Anaya-Garzon *et al.*, 2021). El desarrollo de estos procesos facilitaría el reciclaje de metales e indirectamente disminuiría su dispersión ambiental.

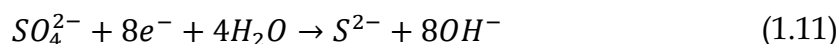
Por otro lado, la biotecnología ofrece también estrategias de biorremediación. Estos procesos están dirigidos al tratamiento de efluentes líquidos industriales (provenientes de procesos como electrólisis, galvanizado, curtiduría, producción de fertilizantes y pesticidas, etc.) y/o cursos de agua (subterráneos o superficiales) contaminados con metales. Los métodos convencionales incluyen la precipitación química, columnas de intercambio iónico, separación electroquímica, filtración con membranas, adsorción con carbono activado, entre otros. Sin embargo, todas estas tecnologías presentan costos muy elevados y pierden considerablemente su efectividad cuando tratan con residuos con concentraciones de metales menores a 100 mg/L (Bilal *et al.*, 2013). Precisamente, cuando las áreas contaminadas son extensas y las concentraciones metálicas no son demasiado altas, los procesos de biorremediación son potencialmente los más adecuados.

En los procesos de biorremediación, las dos estrategias habituales son la bioestimulación y la bioaumentación. En la primera, se modifican las condiciones del lugar contaminado, incluyendo el eventual agregado de nutrientes, con el propósito de favorecer el desarrollo de ciertos microorganismos –ya presentes en el ambiente– que pueden degradar, transformar o inactivar los contaminantes presentes. En la bioaumentación, microorganismos que tienen

esas capacidades son inoculados en el lugar afectado; estos microorganismos pueden provenir de ambientes similares o, incluso, del mismo ambiente, pero se los cultiva previamente de modo de obtener un inóculo viable y potente.

En el caso de los metales pesados, debido a la imposibilidad de su degradación, los procesos de remediación están dirigidos a la transformación en especies con menor toxicidad y/o diferente solubilidad. En los casos de matrices líquidas contaminadas (aguas superficiales, aguas subterráneas, etc.), la mayoría de los procesos de biorremediación está dirigida a la inmovilización bajo formas sólidas que facilitan su separación del líquido. Los dos procesos biológicos más relevantes para la inmovilización de metales son la bioprecipitación y la biosorción.

La bioprecipitación es el análogo biológico de la precipitación química, que es uno de los tratamientos de efluentes líquidos con alto contenido metálico más extendidos dentro de la industria. Esta biotecnología aprovecha la capacidad de algunos microorganismos para producir metabolitos que directa o indirectamente provocan la precipitación de los metales. Aunque hay muchos casos estudiados a nivel de laboratorio, los agentes biológicos fundamentales de esta biotecnología son los microorganismos sulfato-reductores, existiendo, incluso, algunas aplicaciones a nivel de campo (Appels *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2018; Rambabu *et al.*, 2020). Estos microorganismos son anaeróbicos y utilizan sulfato como aceptor final de electrones generando sulfuro como producto (**ec. 1.11**) (Barton & Hamilton, 2009).



Los principales géneros de bacterias sulfato-reductoras son *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Thermodesulfobacterium* y *Thermodesulfovibrio*. Las temperaturas de crecimiento óptimas de estos microorganismos son variadas y se conocen tanto especies psicrófilas, mesófilas como termófilas. Si bien la mayoría de estas especies son neutrófilas, recientemente se han descritos algunas especies acidófilas (Koschorreck, 2008; Willis *et al.*, 2019).

En soluciones acuosas, la especiación del sulfuro depende del pH (**Figura 1.6**), y a valores cercanos a la neutralidad –en que crecen la mayoría de estos microorganismos– predominan las especies HS⁻ y H₂S.

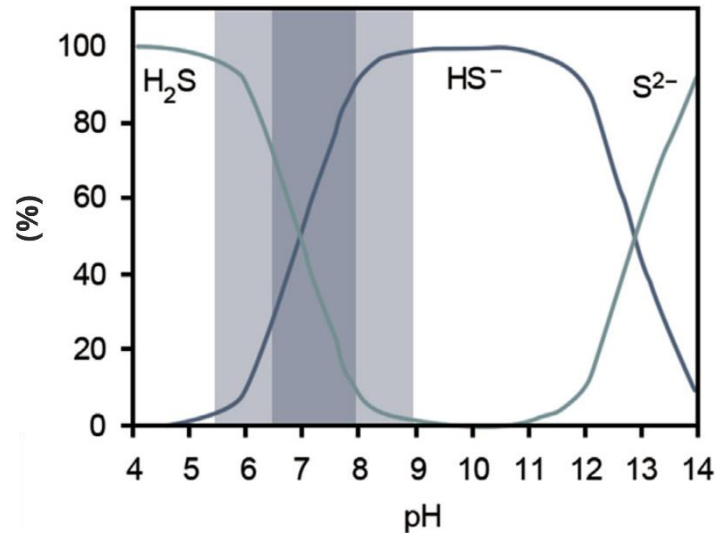
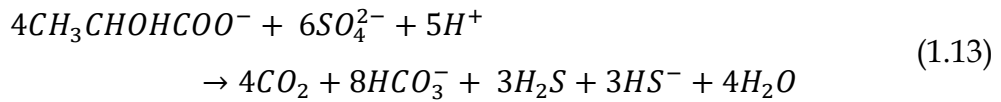


Figura 1.6 – Concentración relativa de las especies de sulfuro en función del pH. Sombreada se muestra el rango neutrófilo. (Figura modificada de Rambabu et al. (2020)).

Aunque el sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas altamente tóxico, corrosivo e inflamable –por lo que su generación y liberación debe ser controlada–, el sulfuro soluble en esas condiciones (HS⁻) puede reaccionar con los cationes metálicos (M) presentes formando compuestos de muy baja solubilidad (pK_{ps}>20) lo que facilita su inmovilización (**ec. 1.12**) (Monhemius, 1977).



Estos microorganismos pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y energía, como moléculas orgánicas sencillas (etanol, metanol, acetato, lactato) o hidrogeno (H₂). En el metabolismo de oxidación de estos compuestos, en condiciones de pH cercano a la neutralidad, se consumen protones, lo que genera la alcalinización del medio (la **ecuación 1.13** ejemplifica la oxidación completa de lactato por parte de un microorganismo sulfato-reductor).



La bioprecipitación se ha utilizado, principalmente, a escala de campo en tratamientos específicos *in-situ* (es decir, en el mismo sitio afectado); alternativamente, también se lo ha utilizado en tratamientos *ex-situ*, donde el material afectado es transportado y tratado en biorreactores. El tratamiento en biorreactores usualmente tiene un costo significativamente mayor y con mayores riesgos de dispersión ambiental respecto de un tratamiento *in-situ*. Como ventaja, las estrategias *ex-situ* permite diseñar sistemas en los que la bioprecipitación de los cationes y el crecimiento microbiano se da en compartimentos separados (sistemas *off-line*); esto posibilita una posterior recuperación de los metales inmovilizados (lo cual sería impracticable en un sistema *in-situ*). La **Figura 1.7** muestra algunos de los diseños *ex-situ* desarrollados actualmente.

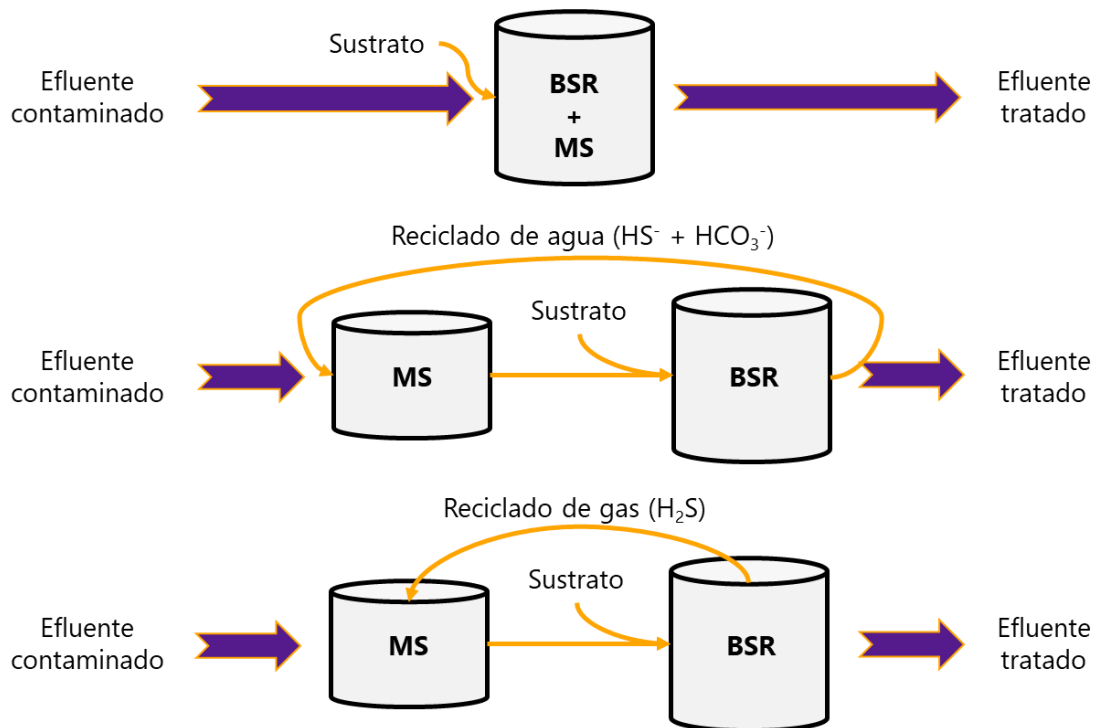


Figura 1.7 – Diseño de algunas estrategias *ex-situ* para el tratamiento de aguas contaminadas con metales utilizando bacterias sulfato-reductoras (BSR). Estos sistemas se basan en la inmovilización del metal como sulfuro metálico (MS) por reacción directa con el cultivo (diseños *in-line*, esquema superior), o indirectamente, a través del reciclado de las soluciones sulfuradas biogeneradas o por insuflado del gas producido durante el crecimiento microbiano (diseños *off-line*, esquema central e inferior) (Figura a partir de Rambabu et al. (2020)).

Tal cual se discutió para los procesos mineros, el esfuerzo por mejorar estas aplicaciones biotecnológicas está focalizado en la búsqueda de nuevas especies (o cepas) más eficientes y/o resistentes a otras condiciones (por ejemplo, menores valores de pH) o más versátiles frente a los cambios. Nuevamente, el uso de comunidades o consorcios microbianos que manifiesten capacidades de precipitar metales puede proporcionar buena parte de estas soluciones.

Un proceso alternativo de biorremediación que ha alcanzado la etapa de aplicación comercial es la *biosorción*. Se denomina así a un conjunto de técnicas que utilizan células (biomasa) o compuestos biológicos (biopolímeros) para adsorber determinadas especies químicas entre las que se encuentran los metales.

La biosorción incluye procesos pasivos y superficiales de naturaleza fisicoquímica que son independientes de la actividad metabólica y que, por lo tanto, pueden ocurrir tanto sobre microorganismos viables como sobre no viables. Usualmente, la biosorción comprende también al proceso denominado *bioacumulación* que consiste en la acumulación de metales en el interior de la célula a través de mecanismos metabólicos. Los procesos de biosorción no metabólicos son muy rápidos y eficientes y, dependiendo del tipo y origen de la biomasa utilizada, mucho más baratos que los tratamientos tradicionales (Volesky, 2001). Diferentes tipos de biomazas han sido estudiados: bacterias, algas, hongos, levaduras y polímeros extracelulares (EPS), abarcando todos los metabolismos; aunque, predominantemente, se trata de heterótrofos neutrófilos. Una alternativa de muy bajo costo es la utilización de biomazas descartadas en otros procesos industriales, lo que, además, valoriza un material que de otra manera sería desechado (Zhao *et al.*, 2016).

En las adsorciones sobre la superficie celular, los polímeros extracelulares (EPS) juegan un rol fundamental. Los EPS son un complejo conjunto de biopolímeros de alto peso molecular que contienen polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, ácido urónico, lípidos, entre otras biomoléculas. La composición exacta de los EPS depende no sólo del organismo que la produce, sino de las condiciones ambientales (o de cultivo) en que lo hace y la etapa de

crecimiento en que se encuentra (Sheng *et al.*, 2010). Las bacterias que producen EPS los secretan cubriendo su pared y funcionando como un mecanismo de defensa que impide el ingreso de especies potencialmente tóxicas, como los iones metálicos; interesantemente, la presencia de estos compuestos induce o incrementa su producción. La interacción entre las especies metálicas (usualmente cationes) y los EPS depende de la presencia de ciertos grupos funcionales y del pH del medio; cuando el pH del medio supera el pKa de un grupo funcional de los EPS, estos adquieren carga negativa y pueden atraer y atrapar cationes metálicos. La inmovilización de los cationes metálicos sobre la superficie de los EPS también puede ser mediada por la microprecipitación y la complejación. Independientemente del mecanismo predominante, los EPS presentan una muy elevada capacidad de sorción y son de gran interés por su potencial biosorbente (Gupta & Diwan, 2017).

Una de las principales ventajas del proceso de biosorción no metabólico es que se puede revertir para recuperar el metal sorbido. Esta reversión se puede conseguir mediante tratamientos físicos (exposición a microondas, sonicación o calentamiento) y/o químicos (elusión con soluciones diluidas de bases, ácidos o complejantes) en los que tanto el metal adsorbido como el biosorbente son recuperados. Para algunas biomasas, este ciclo adsorción-reversión puede repetirse varias veces sin pérdida considerable de capacidad de adsorción. En el caso del proceso de bioacumulación, la recuperación del metal sólo puede realizarse a través de la destrucción de la biomasa imposibilitando su uso posterior, por ejemplo, a través del tratamiento con ácidos fuertes o por calcinación. Estos métodos también pueden ser recurridos cuando se utilizan biomasas de muy bajo costo.

La eficiencia de la biosorción solido-líquido puede evaluarse a través de isotermas de equilibrio. Existen muchos modelos para ajustar las isotermas de equilibrio, aunque los más ampliamente usados son el modelo de Langmuir (ec. 1.14), basado en sorción sobre una monocapa, y el modelo de Freundlich (ec. 1.15), que supone la posibilidad de sorción en multicapas.

$$q_e = \frac{q_{max}bC_e}{1 + bC_e} \quad (1.14)$$

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (1.15)$$

Donde q_e es la masa adsorbida por masa de biosorbente en equilibrio (llamada *capacidad de sorción*), q_{max} la capacidad de sorción máxima, C_e la concentración de metal soluble en equilibrio (o del sorbato en cuestión), b una constante relacionada a la afinidad biosorbente-metal, K_f una constante relacionada a la capacidad de sorción y n una constante relacionada a la intensidad de sorción.

Ambos son modelos esencialmente empíricos y desarrollados para sorciones de gases sobre sólidos, su aplicación a procesos de biosorción produce, en general, buenos ajustes y constituye un primer paso necesario para evaluar la capacidad de distintos biosorbentes para capturar iones metálicos (Wang & Chen, 2009). No obstante, no contiene otras variables que tienen un efecto significativo sobre la biosorción (por ejemplo, el valor de pH que, tal cual se ha descrito previamente, es crítico para sorciones de especies metálicas) y su efecto debe probarse de manera independiente.

Los procesos de biosorción pueden realizarse en reactores agitados con el adsorbente inmovilizado en algún soporte (alginato, poliacrilamida, polisulfona, sílice, celulosa, entre otros) para permitir el pasaje de efluente líquido contaminado en forma continua o semicontinua sin pérdida de la biomasa (Volesky, 1990). Algunos biosorbentes son competitivos en eficacia con los sorbentes tradicionales y pueden ser significativamente menos costosos dependiendo del origen. No obstante, aunque hay biosorbentes comerciales, su aplicación a nivel industrial es escasa. La principal dificultad con la que se enfrenta esta biotecnología es la obtención masiva del biosorbente, su reutilización y su efectividad a largo plazo (Wang & Chen, 2009; de Freitas *et al.*, 2019).

La obtención de mejores biosorbentes está centrada en la búsqueda de microorganismos en ambientes contaminados que utilicen la biosorción para

impedir el pasaje de iones metálicos. La biosorción utilizando comunidades o consorcios microbianos, nuevamente, incrementa la versatilidad de la biotecnología, permitiendo su aplicación sobre diferentes metales y bajo distintas condiciones. Por otro lado, el uso de biomoléculas disminuye la heterogeneidad inherente a las biomasas permitiendo resultados de mayor reproducibilidad.

Dentro de las biotecnologías ambientales, también se puede incluir a aquellas metodologías de carácter biológico que están orientadas a la prevención y el monitoreo de ambientes en riesgo. El uso de agentes biológicos para evaluar las condiciones de un ambiente particular (*bioindicador*) tiene su origen en el uso de aves, particularmente canarios, en las minas de carbón para detectar la presencia de monóxido de carbono (inoloro y letal a muy bajas concentraciones) y metano (tóxico y explosivo). La menor capacidad pulmonar del ave implica una mayor sensibilidad a estos compuestos, de modo que su muerte funcionaba como una alerta temprana para la evacuación preventiva de las instalaciones.

Precisamente, un *bioindicador* es un agente biológico que exhibe un comportamiento observable o medible que puede correlacionarse con un acontecimiento en particular, como puede ser la presencia/ausencia de un compuesto, cambios en la temperatura o en el pH, etc.

Los bioindicadores dan señales que se utilizan como alertas prematuras de alguna condición particular y, en general, pueden extrapolarse a ambientes similares conservando su función preventiva. Alternativamente, los bioindicadores pueden ser utilizados en procesos de *biomonitoreo*. El biomonitoreo implica el seguimiento a lo largo del tiempo de un ambiente particular a través de la utilización de diversos (bio)indicadores; en estos procesos se hace hincapié en las propiedades y particularidades de un ecosistema específico.

Los indicadores fisicoquímicos (concentración de un compuesto determinado, carga de carbono, salinidad, conductividad, potencial redox, porcentaje de oxígeno disuelto, etc.) entregan valores precisos y concretos de ciertos parámetros, pero únicamente representan una imagen instantánea del

momento en que se realizó la medida y del sitio específico en el que se obtuvo la muestra y, además, en general, no son sensibles (al menos, no lo suficiente) a fluctuaciones o a eventos ocurridos en la cercanía. Las determinaciones fisicoquímicas usualmente requieren equipos de alta sensibilidad, con elevados costos y con la necesidad de personal calificado para operarlos³.

Muchos bioindicadores son capaces de entregar información que excede el momento y el sitio exacto de muestreo, ofreciendo una *visión ecológica*; así, el comportamiento de ciertos organismos nativos y la dinámica de las poblaciones pueden dar indicios de eventos que han ocurrido en el pasado o en la cercanía y cuyos efectos se han dispersado y repercutido en la actualidad. Ejemplo de ello son las cianobacterias como indicadoras de la eutrofización de un cuerpo de agua (*bloom de algas*). A partir de la composición de las comunidades, es posible esbozar cómo el sistema se desenvolverá en el futuro cercano. Este tipo de bioindicadores es un reflejo directo de la situación de la biosfera de un ecosistema; debido a ello, permiten hacer un diagnóstico más certero sobre la *salud* y el riesgo toxicológico e incluso identificar eventos que podrían escalar en la cadena trófica y generar un impacto indeseable (Holt & Miller, 2011).

Existe una gran diversidad de bioindicadores de acuerdo con el hábitat y el tipo y nivel de impacto que se está evaluando; pueden usarse plantas (musgos, líquenes), animales (vertebrados e invertebrados) y/o microorganismos (Parmar *et al.*, 2016). Los microorganismos bioindicadores, en comparación con los macroorganismos, resultan más accesibles, fáciles de muestrear y evaluar, significando un muy bajo impacto en el ambiente de estudio y una reducción en los costos logísticos. Además, ofrecen respuestas significativamente más rápidas a los cambios debido a la elevada tasa de duplicación que suelen tener y, dada su sensibilidad, permiten detectar concentraciones de tóxicos considerablemente menores (Holt & Miller, 2011).

³ Una biotecnología que no será abarcada en este trabajo de tesis, pero que hace foco en estas desventajas de los métodos fisicoquímicos, es la de los biosensores. Los biosensores aprovechan la gran sensibilidad y especificidad de ciertos componentes y/o procesos biológicos y los acoplan a procesos electroquímicos en dispositivos de fácil uso. Sin embargo, presentan las mismas desventajas respecto a la limitada perspectiva ecológica de la determinación.

Un ejemplo interesante es el de las bacterias correspondientes a los taxones *Nitrospirae*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* y *Actinobacteria*, que aumentan su proporción en comunidades de ambientes lóticos cercanas a efluentes de aguas residuales; debido a ello, estos microorganismos pueden considerarse bioindicadores de este tipo de contaminación.

No existen reportes de taxones con esa capacidad para detectar la contaminación con metales (Sagova-Mareckova *et al.*, 2021). Esto puede deberse a que los mecanismos de resistencia a metales suelen estar codificados en elementos genéticos móviles, los cuales pueden transferirse en forma horizontal frente a la presencia del estrés, *sociabilizando* la resistencia entre toda la comunidad (Bruins *et al.*, 2000; Hemme *et al.*, 2016). No obstante, es una vacancia que entra dentro de los objetivos de la presente tesis doctoral.

El avance de las técnicas genómicas y metagenómicas ha ofrecido nuevos métodos para la cuantificación de las poblaciones de los microorganismos y para el estudio de la dinámica de las comunidades ampliando significativamente las posibilidades en estos estudios. Además, se ha abierto la posibilidad de desarrollar genes indicadores (*biomarcadores*) haciendo ya no foco en la presencia de un microorganismo específico, sino de una función en particular. Por ejemplo, los genes relacionados a la reducción de sulfato, *apsA* (codificante para la enzima adenosín fosfosulfato reductasa) y *dsrAB* (sulfito reductasa), han sido propuestos como biomarcadores para la presencia de metales y microplásticos (Yin *et al.*, 2015; Pinnel & Turner, 2019, Sagova-Mareckova *et al.*, 2021).

Las biotecnologías descritas en esta sección son esencialmente más sostenibles, de menor impacto ambiental y, en algunos casos, más costo-efectivas que muchas tecnologías tradicionales. La enorme potencialidad de las biotecnologías en los tiempos venideros justifica la búsqueda y el estudio exhaustivo de nuevos microorganismos con funcionalidades que pudieran ser aplicables a los procesos descritos o a otros de interés; más aún, es oportuna la búsqueda y el estudio de comunidades o consorcios microbianos, ya que estos ofrecerían mayor eficiencia y versatilidad que los cultivos puros. Además, el

estudio de consorcios y comunidades podrían tener injerencia en la investigación sobre el impacto que las actividades antropogénicas han tenido o pueden tener sobre las comunidades nativas y sobre el ambiente. La complejidad de las comunidades microbianas y la imposibilidad práctica de aislar y cultivar los microorganismos miembros de las comunidades ha limitado durante años su estudio; fueron los avances en la biología molecular a principios del siglo XXI y, particularmente, en las tecnologías de secuenciación de ADN, los cuales expandieron considerablemente el horizonte de trabajo y permitieron el desarrollo de la denominada *ecología microbiana*.

1.5. Ecología microbiana, herramientas genómicas y metagenómicas

La ecología microbiana estudia las interacciones que los microorganismos (bacterias, arqueas, hongos, algas) establecen con su ambiente/hábitat natural y las relaciones que desarrollan entre sí (dinámica de la comunidad, cadenas tróficas). Las comunidades microbianas son altamente complejas y cumplen un rol esencial en los ciclos geoquímicos de un ambiente, siendo quienes moldean el ecosistema para las *formas de vida superiores*, por lo que su afectación impacta en toda la biosfera (Barton & Northup, 2011).

Los metales pesados, así como otros contaminantes, ejercen una significativa presión de selección sobre las comunidades microbianas y su presencia en ambientes intensamente expuestos es capaz de moldear comunidades hiper-especializadas (Giller *et al.*, 2009; Epelde *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2016; Hemmat-Jou, 2018). Usualmente, este proceso involucra la pérdida de diversidad y de capacidades funcionales en ese ambiente, disminuyendo su resiliencia y posibilidad de restauración (Stefanowicz *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2016; Sutcliffe *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Tipayno *et al.*, 2018). Se ha observado que el proceso de selección por estrés metálico es acompañado, muchas veces, por mecanismos de resistencia a compuestos que no están presentes en ese ambiente (fenómeno denominado *co-resistencia*); este mecanismo se fundamenta en la transferencia horizontal de genes ubicados en elementos genéticos móviles (plásmidos) los cuales fomentan la formación de comunidades poli-resistentes. Este fenómeno no sólo se da en ambientes intensamente contaminados, sino también cuando las presiones de selección varían en el tiempo, como ocurre en ciertos ambientes extremos sujetos a cambios naturales (Dutta & Pan, 2002; Gogarten *et al.*, 2002; Aminov, 2011; Casacuberta & González, 2013; Boon *et al.*, 2014; Soucy *et al.*, 2015; Hemme *et al.*, 2016; Ullrich *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Orellana *et al.* 2018).

Dada esta sensibilidad de los microorganismos, incluso ante muy pequeños cambios en las condiciones del ambiente, el análisis de la variación del perfil de una comunidad microbiana (es decir, la variación en la abundancia de sus miembros) ofrece una gran resolución para la elaboración de procesos de monitoreo y prevención de ambientes en riesgo o bajo tratamiento. A su vez, la identificación de indicadores biológicos que pudieran alertar tempranamente sobre la presencia de contaminantes en estos ambientes se constituye como una fuerte herramienta de diagnóstico ecológico.

Sin embargo, el estudio exhaustivo de las comunidades microbianas no fue posible sino hasta principios del siglo XXI, cuando las tecnologías de secuenciación de ADN experimentaron un desarrollo sustancial y permitieron superar las dificultades asociadas a la complejidad de las muestras.

La secuenciación de ADN tuvo como principal incentivo la dilucidación del genoma humano. Cuando esto se logró (Venter *et al.*, 2001), la motivación pasó al desarrollo de nuevas tecnologías más costo-efectivas que facilitaran la accesibilidad y permitieran el desarrollo de nuevos estudios genómicos en otras áreas de las ciencias, como el diagnóstico de enfermedades hereditarias, el diseño de vacunas y los estudios ambientales, entre otras. Desde entonces, los avances en informática y electrónica generaron nuevas metodologías de secuenciación masiva conocidas como *high-throughput next generation sequencing* (o, simplemente, NGS).

En la actualidad existe una gran variedad de servicios de secuenciación (tanto NGS como de primera generación), cada uno con sus beneficios y limitaciones particulares de acuerdo con la tecnología utilizada (Metzker, 2010; Morey *et al.*, 2013; Reuter *et al.*, 2015). La elección de una metodología de secuenciación específica depende del objetivo del estudio realizado. Por ejemplo, en los casos en los que se requiere identificar un microorganismo aislado, es posible realizar la secuenciación completa o parcial del gen 16S ARNr (si se trata bacterias y arqueas). En este caso, la tecnología más utilizada es la secuenciación de Sanger, que fue una de las primeras metodologías desarrolladas; esta se basa

en una síntesis controlada con desoxinucleótidos (dNTPs) y didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluoróforos distintivos para cada base (C, G, T y A) para revelar luego las secuencias marcadas a través de una electroforesis capilar acoplado a un detector de fluorescencia. La tasa de error de esta metodología no permite secuenciar el total de pares de bases que contiene el gen 16S ARNr (más de 1600), sino apenas una fracción (normalmente entre 400 y 1000 pb), lo que limita la resolución. No obstante, usualmente esta resolución es suficiente para los objetivos planteados. Una alternativa, entre las NGS, es la secuenciación del gen completo por secuenciación en tiempo real de una única molécula de ADN (*single-molecule real-time sequencing, SMRT*), tecnología desarrollada por Pacific Biosciences (Pacific Bioscience of California, EEUU) y que en forma coloquial se llama PacBio. Esta metodología permite obtener lecturas de gran longitud (entre 10 - 60 kb) durante 50 000 lecturas, generando 1 Gb de información por corrida. La gran cantidad de lecturas y la longitud de los fragmentos hace que la tasa de error pueda ser compensada. Sin embargo, el costo de esta tecnología es muy superior a las otras NGS y al método de Sanger. Por esta razón, el método de Sanger sigue siendo el elegido para la identificación de microorganismos aislados, mientras que PacBio se prefiere para secuenciaciones de genomas completos en etapas más avanzadas de la investigación.

Ninguna de las dos tecnologías descriptas es adecuada para el estudio de muestras heterogéneas (comunidades o consorcios microbianos); en ese caso, la plataforma de secuenciación más utilizada es la de Illumina (Illumina, EEUU). Esta metodología consiste en el *anclado* de las moléculas de ADN sobre una superficie soporte a través de una secuencia adaptadora que es ligada en los extremos de las moléculas de ADN de la muestra. El ADN anclado es *recortado* en fragmentos de entre 50 pb y 300 pb a través de una amplificación de PCR específica o de una amplificación inespecífica (*shotgun*). En el caso de los estudios de diversidad, una región del gen 16S ARNr es amplificada por PCR utilizando *primers* específicos y el amplicón resultante es secuenciado. Una vez el ADN anclado sobre el soporte ha sido amplificado, se realiza una reacción de polimerasa con dNTPs marcados con fluoróforos diferentes para cada base y

con una modificación reversible que detiene la elongación para que las bases se agreguen una por vez. La lectura se realiza desde ambos extremos del fragmento por lo que cada secuencia es leída dos veces (proceso denominado *paired-end reads*). Finalmente, la secuencia se revela tras cada ciclo a través de una cámara con detección de fluorescencia. Como resultado, millones de secuencias, que pueden ser diferentes entre sí, son analizadas simultáneamente.

Una ventaja considerable de la plataforma de Illumina es la posibilidad de adicionar al adaptador (que liga la secuencia al soporte) una pequeña secuencia (*barcode*) que identifique a la muestra. De esta manera, utilizando diferentes *barcodes* es posible secuenciar sobre un mismo soporte y en una misma corrida varias muestras simultáneamente. Este procedimiento, denominado *metabarcoding*, además de reducir considerablemente el costo del servicio, unifica el error atribuido a la polimerización y al proceso de secuenciación, permitiendo una mejor comparación de los resultados obtenidos para las diferentes muestras.

La gran cantidad de datos que generan las NGS y su complejidad ha hecho necesario el desarrollo de nuevas herramientas de análisis bioinformático. En el caso de los análisis de genomas completos, la demanda se da sobre la capacidad de procesar los datos, ya que es necesario alinear millones de fragmentos de corta longitud (~100 pb en el caso de Illumina) para construir fragmentos más largos (*contigs*) y, en lo posible, un fragmento único (el genoma). En los estudios de diversidad, cada fragmento corresponde a un microorganismo y no es necesario construir *contigs*, por lo que el análisis de los datos es menos demandante (aunque no despreciable); sin embargo, el análisis estadístico posterior requiere una considerable capacidad de cálculo y procesamiento, ya que es necesario comparar y evaluar decenas de muestras con centenares o miles de variables cada una (cada microorganismo presente es una variable con valor igual a su abundancia).

R es un lenguaje de programación, un *software* libre y un proyecto colaborativo en el que participa una vasta comunidad académica conformada mayormente por estadistas (R Core Team, 2019)⁴. Este software se ha convertido en una herramienta de uso rutinario en las ciencias biológicas (genómicas), ambientales, económicas, médicas, informáticas, entre otras (Cohen & Cohen, 2008; Dalgaard, 2008). R es ante todo una herramienta de cálculo que trabaja con objetos (datos ordenados en una forma determinada) sobre los que se aplican ciertas funciones. Si bien R provee una amplia gama de funciones básicas, en general, estudios específicos requieren de funciones específicas, estas funciones se agrupan en *paquetes*. Un paquete puede entenderse como un grupo de funciones muy especializadas que permiten procesar cierto tipo de información ordenada de una manera particular (objetos) para entregar un resultado. Esta estructura hace de R una herramienta flexible y con la posibilidad de enlazar diferentes análisis bioinformáticos en un único software a través de la complementación de paquetes. Algunos de estos paquetes han sido destinados a resolver la dificultad planteada para el procesamiento de datos durante los análisis de diversidad en estudios ecológicos a través de la secuenciación de 16S ARNr por *metabarcoding*. Es el caso de los paquetes desarrollados por el proyecto Bioconductor⁵, una comunidad colaborativa cuya misión es –según la propia organización– desarrollar, apoyar y diseminar *softwares* libres que faciliten análisis rigurosos y reproducibles dentro de R para distintas áreas de las ciencias biológicas, pero principalmente, orientado a las genómicas. Estos paquetes cuentan con el sustento de la comunidad académica a lo largo de una gran variedad de trabajos científicos (Gentleman *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2015) y son los que han utilizado, mayormente, en este trabajo de tesis.

Por último, y como se ha mencionado, la dificultad de los análisis de diversidad no recae –tanto– en el procesamiento de los datos crudos de secuenciación, sino en su análisis estadístico. Para ello fue necesario el desarrollo de nuevas herramientas estadísticas que permitieran la evaluación de hipótesis a

⁴ <http://cran.r-project.org/>

⁵ <https://www.bioconductor.org/>

partir de la información recabada sobre las comunidades. Esta nueva área interdisciplinaria entre la ecología y la estadística se denominó *Ecología numérica* y fue descrita en 1979 por Legendre & Legendre (2012). Los autores recopilaron, desarrollaron y describieron una gran variedad de herramientas estadísticas (paramétricas, no paramétricas, univariadas y multivariadas) con aplicaciones en estudios ecológicos, sirviendo como guía para que las/os investigadores/as pudieran decidir sobre la mejor manera de llevar a cabo sus análisis. Desde entonces, nuevos métodos y procedimientos se han vuelto disponibles y han permitido analizar de manera más profunda comunidades ecológicas, incluyendo datos de secuenciación masiva utilizando R (Borcard *et al.*, 2011). Los métodos y procedimientos de la ecología numérica han sido el fundamento de los análisis llevados a cabo en gran parte de este trabajo de tesis.

Debido a que el interés central de esta tesis es la interacción de los microorganismos con los metales para su potencial uso en biotecnologías ambientales, son de particular interés las comunidades y los microorganismos que sobreviven en ambientes contaminados o expuestos naturalmente a ellos. Estos microorganismos deberían ser resistentes no sólo a los iones metálicos, sino también a otras condiciones ambientales normalmente asociadas a las altas concentraciones metálicas (bajos valores de pH, elevada salinidad y conductividad). Además de ello, resultan atractivas las comunidades y los microorganismos resistentes y expuestas a otras condiciones que podrían optimizar los procesos biotecnológicos en que intervendrían (por ejemplo, alta temperatura y potencial redox). Los microorganismos y las comunidades microbianas que habitan en ambientes con estas características excepcionales que, en muchos casos, exceden los parámetros de la vida humana se denominan *extremófilos* y se describirán brevemente en la sección siguiente.

1.6. Los microorganismos y las comunidades microbianas extremófilas

Los microorganismos extremófilos se desarrollan en ambientes de condiciones físicas (temperatura, presión, radiación) y/o geoquímicas (salinidad, pH, oxigenación, potencial redox, presencia de compuestos tóxicos, disponibilidad de nutrientes) extremas. Las definiciones de *normal* y *extremo* son esencialmente antropocéntricas, se consideran *normales* a las condiciones fisiológicas dentro de la célula en las que las biomoléculas son funcionales (temperatura entre 10°C y 30°C, pH~7, salinidad entre 0,15 M y 0,5 M de NaCl, 1 atm, agua disponible), mientras que son *extremas* las condiciones alejadas que requieren *modificaciones* específicas para la supervivencia. Estas definiciones sugieren que los microorganismos han evolucionado como adaptación a las condiciones extremas; sin embargo, muchas de estas condiciones extremas dominaron el planeta Tierra durante millones de años, incluso durante el origen de la vida; es por eso por lo que, en términos evolutivos, es muy probable que las modificaciones se dieran en sentido inverso: los microorganismos evolucionaron para sobrevivir a las condiciones que hoy denominamos *fisiológicas* o *normales*.

Algunos ejemplos de ambientes extremos naturales son los desiertos, el permafrost, el continente Antártico y el polo norte, los salares, las regiones volcánicas y geotermales, geiseres y pozos geotermales (*hotsprings*), las profundidades del océano, el espacio exterior y otros cuerpos celestes (Rothschild & Mancinelli, 2001, Merino *et al.*, 2019). De acuerdo con la/s condiciones excepcionales que resisten, los microorganismos extremófilos pueden clasificarse como termófilos, psicrófilos, halófilos, acidófilos, alcalófilos, entre otras. Muchos ambientes exhiben una suma de condiciones extremas (por ejemplo, un *hotspring* puede presentar alta temperatura, bajo pH y alta salinidad), por lo que la mayoría de los microorganismos presentes en esos ambientes son *poli-extremófilos*.

El estudio de ambientes extremos resulta interesante en términos geológicos, ecológicos, evolutivos, astrobiológicos y biotecnológicos. En

particular, el interés evolutivo se centra en que, debido a que algunos sitios extremos se asemejan a la *tierra primitiva*, los extremófilos que los habitan deberían ser evolutivamente más cercanos al primer ancestro común (LUCA). La astrobiología (cuyo estudio se centra en la búsqueda de vida en otros planetas o en la posibilidad de que la misma se desarrolle fuera de Tierra) tiene interés en los extremófilos ya que algunos de ellos habitan condiciones similares a las que dominan otros planetas, y, también, porque constituyen un modelo real de la capacidad de adaptación microbiana (Amils *et al.*, 2007). Más allá de esto, el mayor interés por los extremófilos, sin dudas, está asociado a las biotecnologías que pueden desarrollarse alrededor de ellos (Raddadi *et al.*, 2015; Orellana *et al.*, 2018).

Como se ha discutido en secciones precedentes, los microorganismos adaptados a crecer en condiciones de muy bajo pH (acidófilos) y en presencia de metales, son potencialmente útiles para la biorremediación de metales y para los procesos biomineros. Estos extremófilos, como otros, presentan mecanismos específicos para subsistir en estas condiciones. Así, los acidófilos deben expresar mecanismos que le permitan mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad, para ello cuentan con sistemas de expulsión activa de protones (bombas de eflujo) y modificaciones en la permeabilidad de la membrana. Por su parte, la resistencia a metales puede estar asociada a varios mecanismos pasivos y activos (Dopson & Holmes, 2014). Los mecanismos pasivos se relacionan con la misma condición de acidez: los sistemas que previenen el ingreso de protones generan un gradiente quimiosmótico con un elevado potencial positivo del lado interno de la membrana inhibiendo, a su vez, el ingreso de los cationes metálicos. Entre los mecanismos activos se destacan las bombas de eflujo (que pueden utilizar como fuerza motriz ATP o el mismo gradiente de protones) y la conversión a especies menos tóxicas a través de enzimas específicas (por ejemplo, la reducción de Hg(II) a Hg(0), la oxidación de As(III) a As(V) y la reducción de Cr(VI) a Cr(III)). Otros mecanismos, menos frecuentes en acidófilos, pero presentes en otros microorganismos, son el secuestro intracelular por metalotioneínas y otras proteínas ricas en cisteína, la captura extracelular por

material polimérico liberado al medio o formado sobre la superficie celular (EPS), la disminución de la concentración de catión metálico libre soluble por complejación, estabilización o insolubilización (Bruins *et al.*, 2000). En los capítulos posteriores se ampliarán estas descripciones.

Los extremófilos adaptados a ambientes desérticos (xerófilos) pueden resultar útiles para el tratamiento de suelos áridos o desertificados a causa de la actividad agronómica o el cambio climático; también existen reportes del uso de xerófilos en la biorremediación de ambientes con muy bajo potencial de agua contaminados a causa de la extracción de petróleo (Godoy *et al.*, 2008; Benyahia & Embaby, 2016). Estos microorganismos disminuyen la pérdida de agua produciendo gran cantidad de material polimérico extracelular y acumulando compuestos osmoprotectores como la glicina y el L-glutamato.

La salinización de los suelos es otro problema que afecta a la agricultura reduciendo el rendimiento de los cultivos; algunos microorganismos resistentes a altas concentraciones de sales (halófilos) han mostrado la capacidad de producir biomoléculas que protegen y promueven el crecimiento de las plantas en estas circunstancias. Los halófilos, además, podrían ser usados en el tratamiento de efluentes industriales principalmente de la industria de hidrocarburos. Los halófilos han desarrollado dos vías para mantener un potencial de agua intracelular adecuado: la modificación de todos los sistemas intracelulares para funcionar frente a altas concentraciones de Cl^- y K^+ ; o, alternativamente, impedir el ingreso de estos cationes a través de la acumulación de solutos orgánicos compatibles que neutralizan el potencial osmótico.

Los efluentes de la industria textil, con alto contenido de colorantes y cromo, presentan elevado pH (~ 13); para su tratamiento se ha estudiado el uso de microorganismos alcalófilos capaces de degradar colorantes por acción de enzimas específicas. Para lidiar con el elevado pH, los alcalófilos utilizan sistemas de simporte (ingresando Na^+ y solutos) y de antiporte (ingresando protones y expulsando Na^+).

Los termófilos (capaces de crecer a temperaturas mayores a 45°C) y los hipertermófilos (con temperaturas óptimas mayores a 80°C) son de interés para la industria debido a que la mayoría de los procesos químicos aumentan su velocidad y su rendimiento al aumentar la temperatura. Para sobrevivir en estas condiciones, los termófilos presentan ciertas modificaciones en la composición de su membrana celular, con una mayor proporción de ácidos grasos saturados (en relación con la de los microorganismos mesófilos), y de sus proteínas, con modificaciones en su estructura primaria y secundaria las cuales confieren mayor termoestabilidad.

El interés biotecnológico por los extremófilos incluye, además del uso de los microorganismos, la obtención de sus biomoléculas (por ejemplo, polímeros extracelulares para procesos de biosorción, y biosurfactantes para herbicidas y pesticidas) (Sachdev & Cameotra, 2013; Raddadi *et al.*, 2015; Raveendran *et al.*, 2015) y de enzimas termoestables (una variedad de las llamadas *extremozimas*). En la actualidad, la aplicabilidad de las extremozimas se encuentra limitada por la dificultad técnica de cultivar microorganismos extremófilos a gran escala, dado que las condiciones de crecimiento requeridas son más exigentes para mantener artificialmente en comparación con las de los microorganismos mesófilos *no extremos*. Por esta razón, las extremozimas disponibles en el mercado son escasas, con la excepción, quizás, de la *taq polimerasa* utilizada para la PCR. En respuesta, grandes esfuerzos se están realizando en el desarrollo de un sistema de expresión heterólogo basado en extremófilos, lo que destrabaría la producción y abriría un nuevo horizonte en la industria biotecnológica.

1.7. El sistema Caviahue-Copahue

La búsqueda de microorganismos y comunidades extremófilas capaces de lidiar con altas concentraciones metálicas y con las características asociadas a esa condición fomenta el estudio de ciertos ambientes extremos. En general, los ambientes contaminados por la actividad antropogénica exhiben comunidades microbianas hiper-seleccionadas y especializadas, las cuales han sido forjadas por presiones de selección de gran magnitud y prolongadas en el tiempo (efluentes industriales, drenajes ácidos de minas, residuos agroquímicos). En cambio, algunos ambientes naturales de características extremas presentan condiciones inestables que pueden variar rápidamente en el tiempo, en consecuencia, las comunidades autóctonas no sólo deben desarrollarse bajo diversas presiones de selección físicas y químicas, sino también deben ser capaces de adaptarse rápidamente a las vicisitudes de su hábitat; es decir, deben ser *poli-extremófilos* y versátiles (Orellana *et al.*, 2018).

En este trabajo de tesis la búsqueda está enfocada hacia la interacción entre los metales y las comunidades microbianas para conocer tanto el efecto de la presencia de metales sobre la estructura y la funcionalidad de la comunidad como la transformación que ésta produce sobre las especies metálicas en vistas de posibles aplicaciones biotecnológicas. Debido a ello, resultan de mayor interés los ambientes extremos con la capacidad de soportar cargas metálicas mayores a las que contienen usualmente, o que hayan sido expuestos esporádicamente a concentraciones elevadas. Esta variabilidad permitiría apreciar la capacidad de la comunidad de adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones de su hábitat, es decir, su carácter poli-extremófilo y versátil.

El Parque Provincial Copahue es un área protegida que comprende a la región geotermal de Caviahue-Copahue y se encuentra ubicado en el noroeste de la provincia de Neuquén, en la ladera de la Cordillera de Los Andes (**Figura 1.8**). La naturaleza de esta región está moldeada por la actividad del Volcán Copahue, un estratovolcán que alcanza los 2997 m sobre el nivel del mar, presentando varias manifestaciones geotermales con diferentes condiciones y cursos de agua naturalmente ácidos.

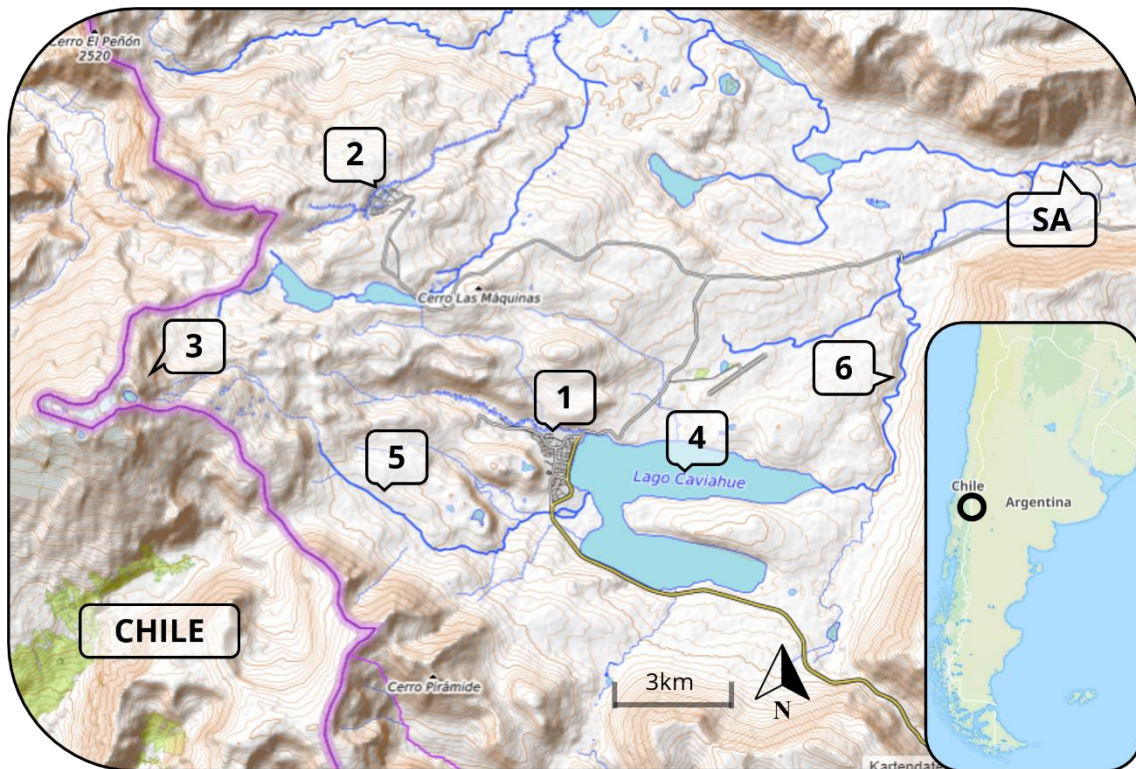


Figura 1.8 – Mapa de la región de Caviahue-Copahue en la provincia de Neuquén, Argentina, sobre el límite con Chile (línea púrpura). (1) Localidad de Caviahue; (2) centro de la villa Copahue; (3) cráter del Volcán Copahue; (4) Lago Caviahue; (5) Río Agrio Superior; (6) Río Agrio Inferior; (SA) cascada Salto del Agrio.

El área ha sido extensamente estudiada desde hace casi 50 años (Jurío, 1977), focalizándose tanto en su naturaleza fisicoquímica (Panarello, 2002; Varekamp, 2004; Gammons *et al.*, 2005; Varekamp *et al.*, 2009; Pedrozo *et al.*, 2010) como ecológica (Lavallo *et al.*, 2005; Chiacchiarin *et al.*, 2010; Urbietta, 2013; Willis *et al.*, 2013; Urbietta *et al.*, 2014; Urbietta *et al.*, 2015a; Urbietta *et al.*, 2015b; Willis *et al.*, 2019; Lopez Bedogni *et al.*, 2020). En particular, Varekamp *et al.* (2009) estudiaron la dinámica química de la región a lo largo de ocho años (1997-2004) tomando muestras en diferentes ambientes del sistema y en diferentes meses; eso les permitió demostrar que la concentración de una gran gama de compuestos varía significativamente año tras año. En la **Tabla 1.1** se muestran algunos de los valores reportados. Esta característica sugiere que la comunidad microbiana autóctona de Caviahue-Copahue debe ser poli-extremófila y versátil.

Tabla 1.1 – Variación de la concentración de algunos metales ($\mu\text{g/L}$) en hotsprings de Copahue, el Río Agrio Superior (RAS) y el Río Agrio Inferior (RAI) en diferentes años

Sitio	Fecha	Cd	Co	Cu	Ni	Zn	Cr	Pb	As
Hotspring	03/1997	90	80	170	550	2450	1540	2290	4520
Hotspring	03/2002	120	180	440	390	10100	750	1330	7250
Hotspring	03/2004	90	110	40	200	5120	710	760	5830
RAS	01/1999	ND	50	50	120	310	170	ND	460
RAS	01/2001	ND	60	110	90	120	20	ND	< LD
RAS	01/2003	ND	20	10	30	130	< LD	ND	< LD
RAI	08/2000	ND	< LD	17	< LD	22	< LD	ND	< LD
RAI	03/2004	ND	< LD	< LD	20	63	< LD	ND	< LD
RAI	11/2004	ND	< LD	10	10	49	< LD	ND	< LD

< LD: Menor al límite. ND: No determinado

El Río Agrio es el curso de agua más importante del área. El río nace en la ladera del volcán Copahue a partir de dos vertientes de alta temperatura cercanas a su cráter; en su nacimiento, las aguas son termales ($\sim 70^{\circ}\text{C}$ dependiendo de la actividad volcánica) y ácidas (valores de pH que oscilan entre 0,5 y 1), con elevado contenido de hierro, sulfato y cloruro. A lo largo de su curso descendiente por la ladera del volcán, la temperatura disminuye rápidamente mientras que el pH asciende hasta desembocar en el Lago Caviahue, a pocos metros del centro de la localidad homónima. El Lago Caviahue es de origen glaciar y presenta pH entre 2 y 4 y temperaturas cercanas a los 8°C . La sección del Río Agrio previa al lago se denomina Río Agrio Superior (**Fig. 1.9**). Luego de atravesar el Lago Caviahue, las condiciones cambian y el –ahora– Río Agrio Inferior exhibe un aumento de pH hasta valores cercanos a 3, esto genera que algunos minerales de su cauce formen compuestos insolubles, en particular, el catión férrico que se hidroliza y se acumula en la ribera y en el lecho confiriendo un color anaranjado-rojizo al paisaje (**Figura 1.10**). Unos 10 km río abajo del Lago Caviahue y 20 km desde el volcán, el Río Agrio Inferior forma una gran cascada de 60 metros de altura llamada Salto del Agrio (**Fig. 1.10**), la cual constituye un punto de atracción turística de gran importancia para la zona.



Figura 1.9 – Foto del Río Agrio Superior

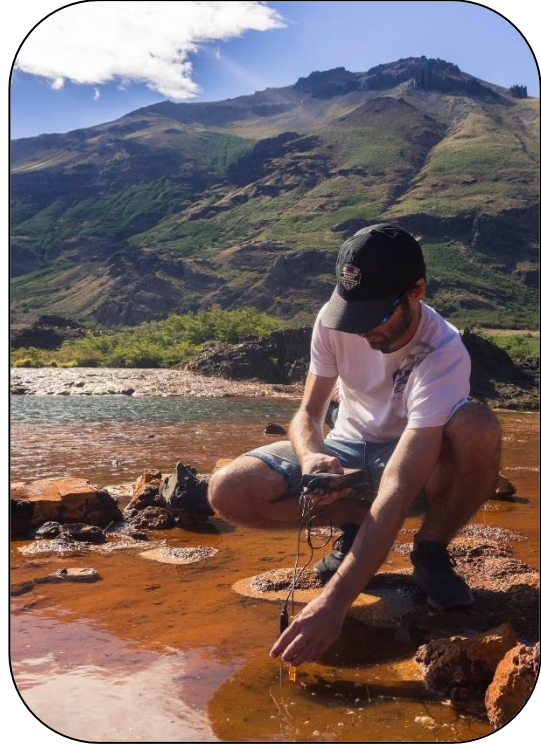


Figura 1.10 – Fotos de las aguas del Río Agrío Inferior y de la cascada Salto del Agrío.

En las cercanías de la villa Copahue, ubicada a 10 km del volcán, existe una gran cantidad de manifestaciones geotermales agrupadas en cinco áreas: Las Maquinas, Las Maquinitas, El Anfiteatro, Chanco-Co y el Centro Termal Copahue. Estas manifestaciones presentan, mayormente, aguas ácidas con temperaturas que pueden alcanzar los 90°C, alto contenido de azufre y sulfuros, hierro y otros cationes. Si bien estas son las características generales, también pueden encontrarse *hotsprings* con temperaturas mesófilas y pH neutral (**Figura 1.11**).



Figura 1.11 – Fotos de algunas manifestaciones geotermales cercanas a la villa de Copahue.

El potencial biotecnológico de la región ha sido demostrado extensamente. Numerosos estudios de biolixiviación y biorremediación de metales han sido realizados utilizando microorganismos aislados de la zona (Urbieta *et al.*, 2021). Giaveno *et al.* (2013) identificaron la especie *Acidianus Copahuensis* proveniente de un *hotspring* del Centro Termal Copahue, una nueva especie de arqueas acidófila y termófila capaz de crecer entre 50°C y 80°C y bajo condiciones de pH entre 1 y 5. Esta arquea es capaz de desarrollarse en cultivos utilizando azufre, tetrionato, hierro(II) y/o sacarosa bajo condiciones aeróbicas pero también bajo condiciones anaeróbicas, oxidando hidrógeno o azufre y utilizando hierro(III) o azufre como aceptor de electrones. Todas estas características hacen de *A. copahuensis* un candidato de gran interés para procesos biomineros (Urbieta *et al.*, 2017; Castro & Donati, 2016).

Por otro lado, se ha reportado actividad sulfato-reductora en los sedimentos de varios *hotsprings* del lugar y se ha logrado el aislamiento de algunas especies nuevas pertenecientes a los géneros *Desulfotomaculum* y *Desulfobacillus* (Willis *et al.*, 2016 y 2019). Estos microorganismos y los consorcios que los contenían mostraron tolerancia a concentraciones moderadas de Ni(II), Cd(II), Cu(II) y Cr(III), mediada por la precipitación de los sulfuros metálicos respectivos. Además, estos consorcios microbianos fueron utilizados para evaluar la posibilidad de tratamiento de un drenaje ácido proveniente del pasivo ambiental Pan de Azúcar, alcanzando resultados prometedores para la inmovilización de Zn y la neutralización de las aguas (Willis, 2016).

Lima *et al.* (2019) realizaron el primer reporte de microorganismos tolerantes a arsénico en la región. En su estudio, mostraron la capacidad de consorcios microbianos litótrofos acidófilos, heterótrofos-neutrófilos aeróbicos y anaeróbicos, obtenidos a partir de muestras de Salto del Agrio, de desarrollarse en presencia de altas concentraciones de As(V), e incluso de As(III). Las resistencias exhibidas fueron vinculadas con diversos genes relacionados con el metabolismo del arsénico. Estos resultados son de interés para eventuales tratamientos de contaminaciones con arsénico de origen natural o antropogénico y, también, para el desarrollo de procesos biomineros en presencia de

concentraciones elevadas de arsénico que pudieran resultar inhibitorias para los microorganismos biolixiviantes.

Por último, Cavello *et al.* (2018) aislaron microorganismos de Las Maquinas que demostraron capacidades asociadas a una gran cantidad de enzimas termoestables como keratinasas, amilasas e inulinasas, todas las cuales tienen gran potencial en diversas industrias biotecnológicas.

Los estudios microbiológicos en este ambiente sumados a la evidencia de los cambios geoquímicos en las concentraciones metálicas que operan en el lugar indican que el sistema Caviahue-Copahue está habitado por comunidades microbianas poli-extremófilas, versátiles y poli-resistentes a metales pesados. No obstante, hasta el momento no se registran estudios sistemáticos que evalúen la tolerancia de las comunidades microbianas (o de los consorcios derivados de ellas) a distintos metales, ni se ha analizado cómo responde la comunidad microbiana ante la presencia abrupta o persistente de grandes concentraciones de ellos. Estos estudios podrían permitir comprender los mecanismos que operan en la adaptación microbiana y facilitar la obtención de consorcios, microorganismos y biomoléculas de interés para uso en procesos biotecnológicos de biorremediación y biominería; además, podrían utilizarse para identificar potenciales bioindicadores para la detección temprana y/o el biomonitoreo de ambientes en riesgo.

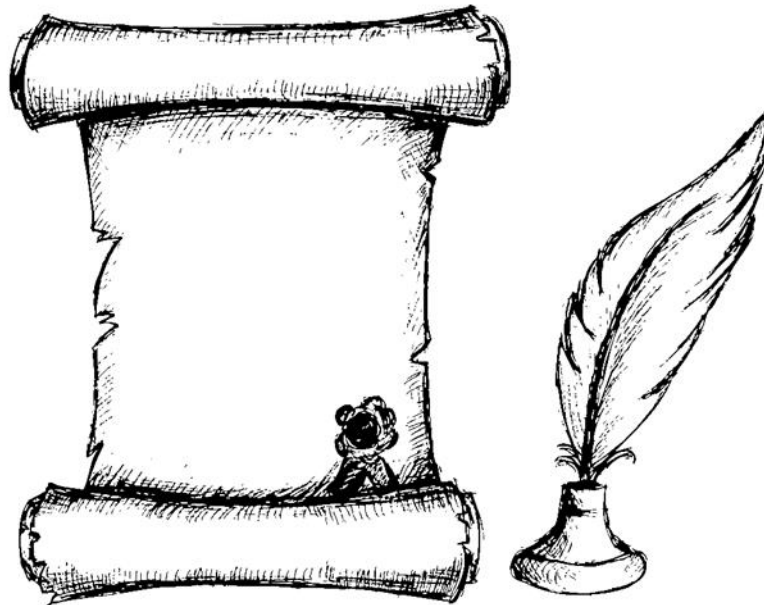
La descripción realizada hasta el momento fundamenta la realización de este trabajo de tesis, el cual, por razones de tiempo, se ha focalizado en 5 metales (cadmio, zinc, cobre, níquel y cobalto). Los mismos fueron elegidos por su interés en función de las reservas nacionales, su importancia estratégica a nivel internacional y, también, la posibilidad de ser utilizados como modelo en la evaluación de las biotecnologías descriptas.



Figura 1.12 – Vista de Caviahue-Copahue desde la ladera del Volcán Copahue. A la derecha puede verse el Lago Caviahue.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

A partir del análisis de la bibliografía existente, que incluyen investigaciones sobre el sistema extremo elegido y también resultados de estudios previos sobre extremófilos resistentes a metales, se establece la siguiente hipótesis central para este trabajo de tesis:

El sistema Caviahue-Copahue posee comunidades microbianas poli-extremófilas (de altas temperaturas y bajos valores de pH) y poli-resistentes a iones metálicos (aun cuando estos no estén presentes actualmente) capaces de desarrollarse bajo diferentes metabolismos.

Esta hipótesis central deriva en las siguientes hipótesis complementarias:

El agregado de iones metálicos a consorcios derivados a partir de las comunidades microbianas autóctonas permitirá el análisis de los procesos de adaptación microbiana y la comprensión de la interacción metales-microorganismos y sus efectos.

Los consorcios resistentes a metales derivados a partir de dichas comunidades microbianas serán eficientes en procesos biomineros y/o en procesos de biorremediación de metales.

Considerando las hipótesis anteriores, los objetivos de esta tesis se enumeran a continuación.

OBJETIVOS

General

Obtener consorcios microbianos poli-extremófilos y resistentes a iones metálicos, bajo distintas condiciones y metabolismos, para su uso en distintos procesos biotecnológicos para la recuperación y remediación de metales.

Específicos

Obtener consorcios microbianos que se desarrollen bajo distintos metabolismos a partir de las comunidades autóctonas (originarias de sitios con diferencias significativas en sus características).

Relevar la tolerancia y eventual resistencia a iones metálicos de los consorcios obtenidos bajo distintos metabolismos.

Caracterizar fisiológica y molecularmente los consorcios microbianos adaptados a diferentes metales y compararlos con los consorcios y con las comunidades originales. Analizar el efecto microbiano sobre las especies metálicas.

Utilizar los consorcios microbianos resistentes en procesos biomineros y de biorremediación de metales.



CAPÍTULO II

Microorganismos del sistema geotermal Caviahue-Copahue: Caracterización y tolerancia a metales pesados



2.1. INTRODUCCIÓN

Algunos metales pesados se han vuelto indispensables para la civilización y son omnipresentes en nuestras vidas cotidianas. Sin embargo, su obtención a partir de las reservas minerales, su producción y uso en procesos industriales, y el descarte de materiales y dispositivos con alto contenido metálico significan un enorme riesgo y un fuerte impacto ambiental. La mayoría de los metales pesados son tóxicos, aún en bajas concentraciones, para casi todas las formas de vida. Dado que no son degradables, pueden afectar sustancialmente un ecosistema, persistiendo en suelos y sedimentos; e incluso, pueden movilizarse a grandes distancias de la fuente primaria de contaminación. Debido a ello, se realizan numerosos esfuerzos para estudiar, investigar y desarrollar nuevas tecnologías sostenibles para la extracción minera y para el tratamiento de sitios afectados y de efluentes con alto contenido metálico.

El estudio de ambientes extremos ofrece diversas aristas de interés a nivel geológico, ecológico, evolutivo y biotecnológico. En los ambientes intensamente contaminados por la actividad humana, en general, algunos compuestos tóxicos se encuentran en concentraciones altas que suelen mantenerse inalteradas por largos períodos de tiempo determinando la dinámica ecológica de la región y moldeando comunidades microbianas hiper seleccionadas y especializadas. En cambio, ciertos ambientes naturales de características extremas como, por ejemplo, la región geotermal de Caviahue-Copahue en el que están centrados los estudios de este trabajo de tesis, presentan condiciones inestables que pueden variar rápidamente debido a la actividad del volcán Copahue. Estas circunstancias obligan a los microorganismos autóctonos no sólo a desarrollarse bajo diversas presiones de selección físicas y químicas, sino también a adaptarse rápidamente a las vicisitudes de su hábitat. Es por ello que resulta particularmente interesante el estudio sobre **cómo reaccionan estas comunidades extremófilas ante la presencia abrupta o persistente de distintos compuestos tóxicos**. Estos estudios pueden tener injerencia en el desarrollo de

bioindicadores para la detección temprana y/o en el biomonitoreo de ambientes en riesgo. Sumado a ello, esa condición necesaria de poli-resistencia y versatilidad hace de los microorganismos de estas regiones de gran interés científico y tecnológico *per se*; en consecuencia, la búsqueda y el aislamiento de especies extremófilas han sido objetivos de muchos equipos de investigación en el mundo desde hace décadas, permitiendo alcanzar numerosos y exitosos resultados. En los últimos tiempos, el interés se ha diversificado hacia la búsqueda de consorcios microbianos con determinadas características metabólicas y de resistencia ya que, gracias a las relaciones cooperativas y simbióticas entre organismos, han mostrado mejores resultados que los microorganismos puros en muchas aplicaciones tecnológicas.

En función de los objetivos generales de este trabajo de tesis, en este capítulo se han concentrado los estudios dirigidos **a la obtención de consorcios tolerantes o resistentes a metales pesados**. Se han focalizado los estudios sobre cinco metales pesados (cadmio, cobalto, cobre, níquel y zinc) en base a su relevancia nacional, tecnológica y/o por el riesgo ambiental que representan.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Muestras ambientales

Los estudios de este trabajo de tesis se realizaron con muestras de la región volcánica y geotermal de Caviahue-Copahue (Neuquén, Argentina) (**Fig. 2.1**) recolectadas durante una campaña de muestreo en febrero del año 2015. Los dos sitios estudiados fueron Agua de Limón (AL) (37°49'01" S, 71°05'37" O) y Salto del Agrio (SA) (37°48'36" S, 70°55'26" O). El primer sitio es un área con varias manifestaciones geotermales (*hotsprings*) ubicada a 10 km del volcán Copahue en las afueras de la villa homónima. Salto del Agrio, en cambio, es una gran cascada en el paso del Río Agrio Inferior, a 10 km corriente abajo del lago Caviahue y a 20 km del volcán. Las muestras, consistentes en sedimento y agua, fueron tomadas en frascos de plástico estériles de 1 L y se conservaron a 4°C hasta su uso en el laboratorio.

Diferentes parámetros fisicoquímicos fueron medidos *in-situ*. Temperatura, conductividad, potencial redox y pH fueron determinados utilizando un equipo portátil Hanna Hi 8424 (Hanna, Gran Bretaña) calibrado con los estándares apropiados. La concentración de sulfuro fue medida según el método del azul de metileno con un equipo HACH DR-850 (HACH, EEUU). Posteriormente, en el laboratorio, las muestras fueron filtradas y en los filtrados se determinaron las concentraciones de diferentes metales (Cd, Ca, Co, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb, K, Na y Zn) por espectrometría de absorción atómica utilizando un equipo Shimadzu AA-6650 (Shimadzu, Japón). La concentración de arsénico fue medida con el kit colorimétrico Merckoquant Arsenic Test (Merk, EEUU). Todas las técnicas analíticas utilizadas en este trabajo de tesis están descriptas en el **Anexo I**.



Figura 2.1 – La región de Caviahue-Copahue (B) al noroeste de la República Argentina en la provincia de Neuquén (A). En el mapa (B) se marcan la ciudad de Caviahue (1) y la villa Copahue (2) ubicadas en la ladera este del volcán Copahue (3). El Río Agrio Superior (5) desciende desde el volcán hacia la Lago Caviahue (4). Luego del lago el Río Agrio Inferior (6) sigue su curso formando varias cascadas entre las que se destaca la denominada Salto del Agrio (SA). Agua de Limón (AL) es una zona de manifestaciones geotermales en las afueras de la villa Copahue.

2.2.2. Enriquecimientos a través de cultivos en batch

Se realizaron enriquecimientos de las dos muestras, bajo condiciones en batch, favoreciendo microorganismos con distintas facultades metabólicas; las mismas fueron elegidas tan versátiles como fue posible, priorizando las posibles aplicaciones biotecnológicas asociadas a la interacción con los metales pesados. Los enriquecimientos seleccionados estaban dirigidos a favorecer los siguientes tres grupos de microorganismos: autolitótrofos (y en particular, acidófilos), organótrofos aeróbicos y organótrofos anaeróbicos. Por simplicidad, usualmente mencionaremos a los tres grupos como acidófilos, organótrofos y anaeróbicos, respectivamente.

Las fuentes inorgánicas de energía seleccionadas para el primer grupo fueron hierro(II) y azufre para favorecer, en principio, microorganismos hierro y azufre-oxidantes. Por ello, en los enriquecimientos se utilizó el medio de cultivo MAC (Mackintosh, 2009) a pH 2,5, con agregado de FeSO_4 (3 g/L de Fe(II)) y azufre elemental (10 g/L); debido a que algunos microorganismos con estas capacidades metabólicas suelen tener comportamiento mixotrófico, se adicionó una pequeña concentración de extracto de levadura (0,1 g/L).

Los organótrofos aeróbicos fueron seleccionados en medio Luria Bertani (LB) a pH 6,5. En el caso de los organótrofos anaeróbicos, se priorizó el favorecimiento de eventuales microorganismos sulfato-reductores; debido a ello, los enriquecimientos se hicieron en un medio Postgate (Postgate, 1984) modificado en función de reducir la precipitación abiótica de metales causada por el elevado contenido de fosfatos del medio (Trevors *et al.*, 1985; Knotek-Smith *et al.*, 2003). Se realizaron varias pruebas con distintas formulaciones incubándose el medio a 30°C y 45°C con agregado de distintos metales para analizar la posible formación abiótica de precipitado. El medio seleccionado (para el cual no se observó precipitación) se denominó PgF y su composición es la siguiente: NH_4Cl (1 g/L), Na_2SO_4 (1 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,10 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,80 g/L), lactato de sodio (3,50 g/L) y extracto de levadura (0,50 g/L), con pH ajustado en el

intervalo 6,8-7,3. El contenido de sulfatos de este medio es 1 g/L. Los medios de cultivo fueron autoclavados por 18 minutos a 121°C antes de la inoculación.

La inoculación de los medios se realizó con 2 g de la muestra ambiental en 90 mL de medio utilizando frascos Erlenmeyer en los casos aeróbicos. Los enriquecimientos anaeróbicos se realizaron en viales sellados herméticamente con tapas de goma y virolas metálicas; antes del sellado, el medio fue burbujeado con N₂ (libre de O₂) por 60 minutos. En el primer enriquecimiento en medios anaeróbicos, se hizo un control en medio Postgate B (Postgate, 1984) para verificar que el medio modificado (PgF) resultara adecuado para el desarrollo microbiano. Cada enriquecimiento fue realizado por duplicado. Todos los enriquecimientos se incubaron a temperaturas próximas a la del ambiente originario de la muestra, 30°C para SA y 45°C para AL.

El desarrollo microbiano en los enriquecimientos fue seguido de forma cuali y cuantitativa. En los enriquecimientos bajo condiciones litotróficas se midieron: pH con multímetro y electrodo de vidrio, concentración de Fe(II) utilizando permanganometría y población microbiana por recuento en microscopio óptico (**Anexo I**). En los enriquecimientos bajo condiciones organotróficas aeróbicas se siguió la densidad óptica a 600 nm y se realizaron recuentos celulares a través de microscopía óptica. Los enriquecimientos anaeróbicos fueron controlados a través de recuento de células al microscopio óptico y, en el caso de los cultivos en Postgate B, a través de la aparición de precipitado negro de sulfuro de hierro(II) (FeS).

En todos los enriquecimientos donde hubo desarrollo microbiano, se tomaron muestras en tubos de 12 mL herméticamente cerrados que se almacenaron a 4°C para análisis moleculares posteriores.

2.2.3. Cinéticas de crecimiento de los enriquecimientos. Influencia de la exposición a metales pesados

A partir de los enriquecimientos positivos se realizaron dos series de ensayos utilizando cultivos preparados a partir de los enriquecimientos.

La primera serie de ensayos implicó el seguimiento en el tiempo del crecimiento de cada cultivo para construir las cinéticas respectivas. Para ello, se usaron 5 mL del enriquecimiento correspondiente como inóculo de 95 mL de medio fresco en las mismas condiciones en las que se habían hecho los enriquecimientos.

Los ensayos fueron realizados por triplicado y se incluyeron controles abióticos; en éstos, el inóculo fue reemplazado por igual volumen de agua estéril.

La segunda serie de ensayos implicó una exposición abrupta a distintos metales pesados (cadmio, cobalto, cobre, níquel, zinc) para evaluar la tolerancia de cada enriquecimiento. La adición de los metales se hizo a partir de soluciones stock de alta concentración en CdSO_4 , CoCl_2 , CuSO_4 , NiSO_4 y ZnSO_4 . Antes de ser utilizadas para agregar a los distintos cultivos, estas soluciones fueron filtradas a través de membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ de diámetro y luego a través de membranas de $0,22\ \mu\text{m}$ de diámetro esterilizadas en autoclave previamente. Esta experiencia se realizó por triplicado en tubos de ensayo conteniendo 9 mL de medio de cultivo con el agregado de distintas concentraciones de cada metal. En el caso de los cultivos anaeróbicos, el ensayo se realizó en viales de 10 mL conteniendo 9 mL de medio (burbujeado previamente con N_2 libre de O_2) y luego incubados en jarras herméticas en presencia de sobres generadores de anaerobiosis Mitsubishi (Mitsubishi Gas Chemical, Japón). En todos los casos se inoculó al 10% y se realizaron controles abióticos para cada caso.

Las concentraciones testeadas (**Tabla 2.1**) fueron elegidas en función de los valores de resistencia e inhibición reportados en bibliografía para distintos microorganismos (Mergeay *et al.*, 1985; Mahapatra *et al.*, 1996; Dopson *et al.*, 2003; Monsieurs *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2020), atendiendo los utilizados para cepas de *Escherichia coli*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*,

Desulfovibrio spp. y, especialmente, *Cupriavidus metallidurans*, el cual ha sido utilizado como microorganismo modelo en muchos estudios de resistencia a diversos compuestos inorgánicos.

Tabla 2.1 - Concentraciones utilizadas para la exposición

Metabolismo	Metal	Concentración en mg/L					
Acidófilo	Cd	31	100	250	500	1500	3000
	Co	59	92	294	368	736	1767
	Cu	40	159	317	635	1270	3177
	Ni	46	183	367	587	2934	4108
	Zn	51	326	653	817	3269	4576
Organótrofo	Cd	10	25	50	117	238	455
	Co	29	58	175	291	719	1403
	Cu	6	19	38	63	155	302
	Ni	29	58	175	290	405	715
	Zn	32	65	195	323	451	797
Anaeróbico	Cd	10	25	63	125	250	500
	Co	44	88	176	368	736	1473
	Cu	9	19	31	79	158	317
	Ni	14	44	88	190	366	733
	Zn	16	49	98	212	408	817

Las cinéticas de crecimiento que se obtuvieron con el primer ensayo permitieron establecer el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en cada condición. En el segundo ensayo, cumplido el tiempo determinado previamente, se realizaron las medidas de los parámetros de crecimiento en cada situación: pH y concentración de Fe en el grupo de autolitotróficos, densidad óptica en el de organótrofo aeróbicos y presencia de precipitados y recuento celular en el de organótrofo anaeróbicos.

2.2.4. Adaptación de los enriquecimientos a metales pesados.

Obtención de consorcios tolerantes

Los enriquecimientos originales fueron sometidos a un proceso de adaptación a los metales de interés con el objetivo de obtener consorcios tolerantes. Para ello, se repicó cada cultivo en el medio fresco correspondiente conteniendo la concentración máxima tolerada en el ensayo de exposición abrupta (**sección 2.2.3**). Una vez transcurrido el tiempo para alcanzar el estado estacionario de crecimiento (determinado en la experiencia descrita en **2.2.3**), se hizo un nuevo repique a la misma concentración; luego se comenzó una sucesión de repiques en los que se iba incrementando (usualmente duplicando) progresivamente la concentración del metal. Este proceso se repitió hasta no observar crecimiento. En los casos en los que se observó un crecimiento parcial, se hizo un nuevo repique en una concentración algo menor del metal y se repitió el procedimiento hasta no observar crecimiento.

Los consorcios obtenidos en los cultivos correspondientes a las máximas concentraciones de metal toleradas fueron almacenados en tubos de 12 mL herméticamente cerrados y mantenidos a 4°C.

2.2.5. Nomenclatura de los consorcios tolerantes

Para facilitar la lectura del trabajo, se impuso una nomenclatura para los consorcios que consiste en un código lógico de cinco letras. Las primeras dos letras, en mayúsculas, corresponden al origen de la muestra ambiental (AL para Agua de Limón y SA para Salto del Agrio); la segunda letra, en minúsculas, corresponde al metabolismo seleccionado ((a) para el autolitotrófico, (o) para el organótrofo aeróbico y (n) para el organótrofo anaeróbico); las últimas dos letras corresponden al símbolo del metal al que fue expuesto ese consorcio (Cd, Co, Cu, Ni o Zn). Los cultivos originales, que no fueron expuestos a ningún metal, concluyen con SM (sin metal). Así, por ejemplo, el consorcio SAoCd es el consorcio proveniente de Salto del Agrio, que responde a un metabolismo

organotrófico en condiciones aeróbicas y que fue adaptado a altas concentraciones de cadmio, mientras que el consorcio ALaSM es el consorcio obtenido a partir de la muestra de Agua de Limón, bajo condiciones autolitotróficas y que no fue expuesto o adaptado a metales.

2.2.6. Análisis comparativo de las tolerancias

El primer análisis comparativo de las tolerancias exhibidas fue realizado para detectar posibles diferencias asociadas con el metabolismo del consorcio. Esta comparación se realizó no sólo con los valores de tolerancia obtenidas durante la exposición abrupta a los metales (**sección 2.2.3**) sino también con las máximas concentraciones alcanzadas luego del ensayo de adaptación (**sección 2.2.4**). En ambos casos, las tolerancias alcanzadas para los consorcios correspondientes a cada metabolismo (una por cada metal) fueron agrupadas y comparadas con las de los otros metabolismos. Debido a que los datos agrupados de ese modo no cumplían con los requerimientos para una prueba paramétrica, se realizó el test de Kruskal-Wallis y cuando se obtuvieron diferencias significativas se realizó el test apareado de Wilcoxon (Dalgaard, 2008; Hollander *et al.*, 2014). Estos cálculos fueron realizados utilizando el *software* libre de cálculo estadístico, R (R Core Team, 2021), aplicando las funciones `kruskal.test` y `pairwise.wilcox.test` (Kloke & McKean, 2014).

Para contextualizar los niveles de tolerancia alcanzados por los consorcios obtenidos, se realizó una recopilación bibliográfica de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de poblaciones y consorcios de procariotas resistentes (Mejías Carpio *et al.*, 2018). La CIM está definida como la concentración más baja de un tóxico que genera inhibición del crecimiento en un microorganismo determinado. Los valores recogidos y su origen se encuentran en el **Anexo II**. Estos valores de CIM se compararon con los valores de tolerancia obtenidos para los consorcios en los estudios de esta tesis, tanto frente a la exposición abrupta como luego de una adaptación progresiva.

2.2.7. Cinéticas de crecimiento de los consorcios tolerantes

Se realizaron cinéticas de crecimiento de todos los consorcios tolerantes obtenidos en presencia de la máxima concentración de metal alcanzada. Las cinéticas se realizaron según lo descrito en la **sección 2.2.3**. Las mismas se realizaron por triplicado incluyendo los controles abióticos con idéntica concentración de metal. Se determinaron los parámetros relativos al crecimiento microbiano tal cual se hizo en las experiencias previas. Además, se determinó la concentración del metal en solución tanto al comienzo como al final de la experiencia. Para ello, se obtuvieron muestras de los cultivos que fueron centrifugadas a 12 000 g durante 8 minutos; los sobrenadantes fueron luego filtrados a través de membranas de 0,22 μm y los filtrados se diluyeron convenientemente en solución de HNO_3 0,14 M antes de ser analizados por espectrometría de absorción atómica utilizando un equipo Shimadzu AA-6650 (Shimadzu, Japón).

Para determinar variaciones estadísticamente significativas de la concentración de metal durante el desarrollo del cultivo (producidas por fenómenos químicos y/o biológicos), se compararon las diferencias entre las concentraciones iniciales y finales en los cultivos y en los controles abióticos correspondientes. Las diferencias fueron evaluadas según el test *t* de Student para muestras independientes (Dalgaard, 2008; Lepš & Šmilauer, 2020).

Las curvas de las cinéticas obtenidas (incluyendo las de la **sección 2.2.3**) fueron analizadas y graficadas en R utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016). Se determinó la variación de cuatro parámetros: población celular, densidad óptica a 600 nm, concentración de hierro(II) y concentración de protones. A partir de estos parámetros se estimó la velocidad específica de crecimiento (μ) y la fase *lag*.

El valor de μ depende de las condiciones de cultivo y está definido por la ecuación de Monod (Monod, 1949):

$$\mu = \mu_{Max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.1)$$

donde S es la concentración de sustrato limitante, K_s es una constante dependiente de la naturaleza del sustrato y μ_{Max} la máxima velocidad específica de crecimiento. En un cultivo en batch, en fase exponencial puede considerarse que S >> K_s y, por lo tanto, μ es igual a μ_{Max}, que puede considerarse constante dadas determinadas condiciones.

El número de células por litro (X) es la concentración de biomasa y está definida en un tiempo dado por la ecuación:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (2.2)$$

Donde X₀ es la concentración de células al tiempo cero (t=0). Si se considera la etapa exponencial de crecimiento (μ=μ_{Max}=constante), la transformación de esta ecuación con la función logaritmo natural resulta en una recta de pendiente μ_{Max} y ordenada al origen Ln(X₀).

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (2.3)$$

A partir de esta función es posible calcular el valor de μ_{Max}.

La densidad óptica de un cultivo es la absorbancia que presenta frente a una longitud de onda específica y está definida por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon b C \quad (2.4)$$

donde A es la absorbancia, ε es una constante específica de la muestra, b el camino óptico y C la concentración de absorbente. Por lo tanto, la densidad óptica (DO) de un cultivo microbiano puede escribirse:

$$DO = KX \quad (2.5)$$

donde K es una constante (K=εb) y X la concentración de biomasa. Aplicando la **ecuación 2.2**:

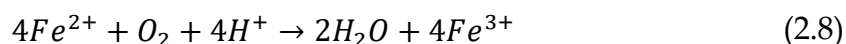
$$DO = KX_0 e^{\mu t} \quad (2.6)$$

Nuevamente, si se transforma la **ecuación 2.6** con la función logaritmo natural y se considera crecimiento exponencial, se obtiene una recta cuya pendiente es μ_{Max} .

$$\text{Ln}(DO) = \text{Ln}(K) + \text{Ln}(X_0) + \mu t \quad (2.7)$$

A partir de las ecuaciones (2.3 y 2.7) se calculó la recta de regresión para los puntos que se observaban en variación lineal. La selección de estos puntos se optimizó de acuerdo con el valor del R^2_{ajustado} obtenido. De la pendiente de dicha recta se obtuvo el valor de μ_{Max} para el consorcio analizado. Luego, se intersecó la recta pendiente con la recta obtenida del promedio de los puntos que se observaron sin variación a la izquierda de la recta pendiente, de esta intersección se estimó la fase *Lag*.

En los consorcios acidófilos litótrofos se midió la concentración de Fe(II) en solución ya que algunos microorganismos de este grupo pueden utilizar el Fe(II) como fuente de energía. Este metabolismo litótrofo hierro-oxidante se describe con la siguiente ecuación:



El ritmo de consumo de un sustrato (r_s) en un cultivo microbiano, en este caso el sustrato es Fe(II), está definida por la ecuación de Pirt (Pirt, 1965):

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{xs}} + X m \quad (2.9)$$

donde r_x es el ritmo de crecimiento del cultivo, Y_{xs} es el rendimiento para el crecimiento con dicho sustrato, y el término Xm representa la fracción de la energía obtenida del sustrato utilizada para el mantenimiento celular.

Durante el crecimiento exponencial puede considerarse que toda la energía obtenida es empleada para el crecimiento y que la fracción destinada a mantenimiento es despreciable; por lo tanto, la **ec. 2.9** puede simplificarse a:

$$r_s = r_x / Y_{xs} \quad (2.10)$$

El ritmo de crecimiento (r_x) es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ) por la concentración de células presentes en un tiempo dado (X).

$$r_s = \frac{\mu X}{Y_{xs}} \quad (2.11)$$

A partir de la **ec. 2.2**:

$$r_s = \frac{\mu}{Y_{xs}} X_o e^{\mu t} \quad (2.12)$$

Si se define la velocidad de consumo de sustrato (r_s) como la variación en el tiempo de la concentración de sustrato ($-\delta s/\delta t$) e integramos la **ec. 2.12** entre el tiempo 0, en el que la concentración de sustrato es S_o , y un tiempo t con concentración de sustrato S, se obtiene la ecuación

$$S_o - S = \frac{X_o}{Y_{xs}} (e^{\mu t} - 1) \quad (2.13)$$

Dado que X_o (la concentración inicial de biomasa) es una constante y que Y_{xs} (el rendimiento del sustrato) puede considerarse constante en fase exponencial, la ecuación previa (2.13) puede reescribirse:

$$S_o - S = K e^{\mu t} - K \quad (2.14)$$

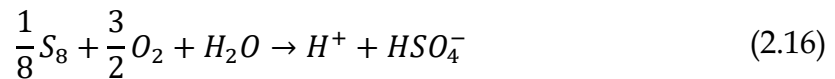
La ecuación (2.14) fue aplicada para el cálculo de μ_{Max} ($\mu = \mu_{Max}$) de los consorcios que utilizaban Fe(II) como fuente de energía. Para ello, los datos de las cinéticas entre el tiempo inicial y el tiempo final de la fase exponencial fueron ajustados al modelo siguiente (2.15) a partir del cual se estimaron los valores de μ y K.

$$Fe(II)_o - Fe(II) = K e^{\mu t} - K \quad (2.15)$$

El ajuste fue realizado utilizando la función nls de R siguiendo el procedimiento recomendado por los autores (Baty *et al.*, 2015). Esta función estima de forma iterativa los parámetros de un modelo a partir de los datos experimentales y requiere el ingreso de valores iniciales de los parámetros a determinar para iniciar la iteración. Estos valores iniciales deben ser aproximados a los verdaderos y pueden estimarse a partir de conocimientos previos. En este caso, se utilizaron los valores de cinéticas de biooxidación de minerales sulfurados (Boon, 1996) para establecer los valores iniciales de μ y K. De ese modo, el valor inicial de μ establecido fue $0,1 \text{ h}^{-1}$ mientras que los valores

de X_0 y del rendimiento (Y_{xs}) se estimaron como 1×10^{10} bacterias/L y 4×10^{10} bacterias/g Fe(II), respectivamente; a partir de esos valores, se estableció un valor de 0,2 g/L para K. Estos valores iniciales se utilizaron para calcular iterativamente los parámetros correspondientes para cada cinética. La bondad del ajuste del modelo obtenido fue evaluada en función de los residuos según describe Baty *et al.* (2015).

Ciertos microorganismos litótrofos utilizan azufre elemental como fuente de electrones. Como producto de este metabolismo se generan protones de acuerdo con la siguiente ecuación:



Por esta razón, en los cultivos litótrofos se determinó la concentración de protones a través de la medida de pH ($pH = -\log([H^+])$). En esta aproximación, se supone que la variación de la concentración de protones es una respuesta directa de la oxidación bacteriana de azufre, despreciando los efectos amortiguadores del medio de cultivo; además, se supone que dicha oxidación es siempre completa cuando en realidad se produce a través de varias etapas.

La cinética de generación de un producto metabólico (r_p) que está asociado directamente al crecimiento microbiano se describe por la ecuación (Doran, 2013):

$$r_p = q_p X \quad (2.17)$$

$$r_p = q_p X_0 e^{\mu t} \quad (2.18)$$

donde q_p es la velocidad específica de generación de producto. Si la velocidad de producción (r_p) se define como la variación de la concentración de producto en el tiempo ($\delta P / \delta t$), entonces:

$$\frac{\delta P}{\delta t} = q_p X_0 e^{\mu t} \quad (2.19)$$

Integrando la **ecuación 2.19** entre tiempo 0 y tiempo t, se obtiene:

$$P - P_0 = \frac{q_p X_0}{\mu} (e^{\mu t} - 1) \quad (2.20)$$

donde P es la concentración de producto en un tiempo t y P_0 la concentración al tiempo inicial. Si se considera fase exponencial, q_p y μ son constantes. La **ecuación 2.20** es similar a la obtenida para la variación de sustrato (Fe(II)) (**ecuación 2.14**) y se analizó de igual forma. Se ajustaron los datos de la concentración de protones al modelo siguiente (**ec. 2.21**) y se calculó el valor de μ_{Max} por iteración utilizando la función nls de R.

$$[H] - [H]_0 = Ke^{\mu t} - K \quad (2.21)$$

Los valores iniciales para el proceso de iteración fueron tomados del trabajo de Boon (1996): $\mu=0,02 \text{ h}^{-1}$ y $K=0,001 \text{ g/L}$.

En los consorcios anaeróbicos, el crecimiento fue seguido sólo por recuento celular; esta determinación es influida negativamente por la presencia de fases sólidas aún después del filtrado de la muestra que enmascaran la lectura y, además, porque una parte significativa de la población microbiana suele estar adherida al sólido. Esto impidió realizar curvas de crecimiento cuantitativamente válidas; debido a ello, para estos cultivos sólo se presentan los valores de recuento celular obtenidos al inicio y al final del crecimiento microbiano.

2.2.8. Análisis de precipitados

La mayoría de los cultivos organótrofos anaerobios mostraron la formación de precipitado. Los precipitados fueron analizados por espectroscopía de dispersión de rayos X (EDX) y por microscopía de barrido electrónica (SEM) utilizando el equipo Quanta-200 Environmental SEM (FEI Company TM, EEUU) equipado con un detector EDXS Silicon Drift Apollo 40. Estos análisis se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física "Ing. Gregorio Cusminsky" (LIMF) (Facultad de Ingeniería, UNLP).

La preparación de la muestra para SEM se describe a continuación. Un volumen de 3 mL de cultivo al final del crecimiento fue centrifugado a 12 000 g durante 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con PBS y luego filtrado en membranas de PCTE de 0,22 μm de diámetro de poro (Merck Millipore, EEUU).

Las membranas fueron cortadas en fragmentos de aproximadamente 1 cm² y cubiertas con 1 mL de ETOH 100% en frascos color caramelo para ser almacenadas a 4°C hasta su observación al microscopio.

Durante la preparación de la muestra para EDX, un volumen de 7 mL de cultivo al final de crecimiento fue centrifugado a 12 000 g durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 1 mL de muestra y centrifugado nuevamente a 12 000 g por otros 10 minutos. El pellet resultante fue lavado dos veces con agua estéril y filtrado en membranas de PCTE 0,22 µm de diámetro. Los filtros fueron almacenados en plaquitas de plástico a 15°C.

Antes del análisis en el microscopio, las muestras fueron secadas al punto crítico y cubiertas con una película de carbono.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Características de las muestras ambientales

La **Tabla 2.2** resume los parámetros fisicoquímicos de las muestras de Caviahue-Copahue que fueron medidos *in-situ*; la tabla también incluye las concentraciones de arsénico y metales que se midieron en el laboratorio. Los metales pesados que fueron considerados para este estudio estuvieron por debajo del límite de detección en la muestra de Salto del Agrio y sólo se detectó cobre en una concentración apenas significativa (0,66 mg/L) en la muestra de Agua de Limón.

Tabla 2.2 - Parámetros fisicoquímicos de las muestras

Parámetro (<i>in-situ</i>)	Salto del Agrio		Agua de Limón
	(agua)	(sedimento)	
pH	3,66	4,18	2,09
Temperatura (°C)	15,5	16,7	44,8
Eh (mV)	368,8	-25,0	-85,7
Sulfuro (mg/L)	0,03	ND	0,35
Oxígeno disuelto (mg/L)	0,3	ND	2,2
Contenido metálico (mg/L)			
Fe	<0,2		76,13
As	<0,005		0,05
Ca	1,96		<0,5
Mg	10,2		0,76
Mn	0,3		0,54
Na	5,8		24,14
K	3,01		16,14
Pb	<0,25		0,34
Cd	<0,5		<0,5
Co	<0,5		<0,5
Cu	<0,5		0,66
Ni	<0,5		<0,5
Zn	<0,15		<0,15

2.3.2. Cinéticas de crecimiento y exposición a metales pesados

Los enriquecimientos en batch de ambas muestras para los tres metabolismos de interés (litótrofos –acidófilos–, organótrofos aeróbicos y organótrofos anaeróbicos) mostraron crecimiento microbiano, con la única excepción del enriquecimiento anaeróbico (tanto en medio Postgate B como en PgF) para la muestra de AL. Este último enriquecimiento, se reiteró varias veces ya que el valor de Eh en la muestra natural hacía estimar posible un crecimiento bajo esas condiciones, no obstante, se obtuvieron idénticos resultados; probablemente los microorganismos de la muestra natural capaces de crecer bajo anaerobiosis, no se desarrollan adecuadamente en los medios o en las condiciones específicas utilizadas.

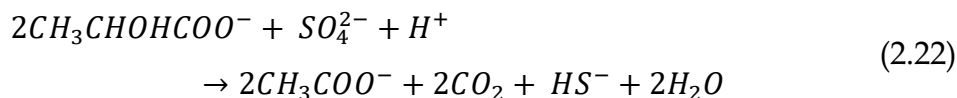
Las cinéticas de crecimiento para los enriquecimientos con desarrollo positivo se han incluido en las **Figuras 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 y 2.6** (ver también **Anexo III**).

El enriquecimiento organótrofo de la muestra de Salto del Agrio (SAoSM) mostró un rápido crecimiento (menos de 12 h) observándose al microscopio óptico una gran diversidad de microorganismos con predominancia de bacilos pequeños y estreptobacilos. El enriquecimiento respectivo para la muestra de Agua de Limón (ALoSM) mostró un crecimiento más lento y una menor diversidad consistente mayormente en bacilos alargados y estreptobacilos.

El enriquecimiento anaeróbico de la muestra de Salto del Agrio (SAnSM) mostró una velocidad de crecimiento mucho más baja que la de los otros enriquecimientos. Este lento crecimiento es frecuente en los metabolismos anaeróbicos que se correlaciona con un rendimiento significativamente menor de energía en comparación a los metabolismos aeróbicos.

El enriquecimiento SAnSM mostró una gran diversidad de microorganismos, siendo la mayoría de ellos móviles. Durante el desarrollo de este enriquecimiento se detectó el olor característico de sulfuro de hidrógeno (H₂S), lo que sugirió la presencia de microorganismos sulfato-reductores. Los microorganismos con este metabolismo utilizan el sulfato como aceptor final de

electrones, reduciéndolo a sulfuro. La **ecuación 2.22** describe este metabolismo utilizando lactato como fuente de carbono.

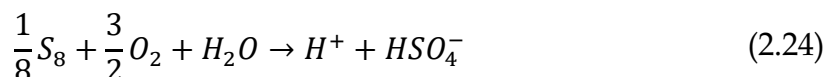


El sulfuro generado se presenta como la especie HS^- en medios acuosos, excepto en condiciones extremas de pH (muy ácidos o muy básicos). En medios acuosos no alcalinos, el principal equilibrio es el siguiente:



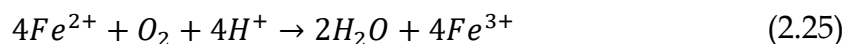
Considerando el valor de la constante de equilibrio, cuando el pH es cuasi neutro, las dos especies sulfuradas existen en concentraciones similares. En consecuencia, el metabolismo sulfato-reductor genera H_2S gaseoso de olor característico.

Las cinéticas de crecimiento para el enriquecimiento litotrófico acidófilo se analizaron de acuerdo con la oxidación de azufre y/o de Fe(II). La oxidación de azufre, catalizada por los microorganismos azufre-oxidantes es representada por la siguiente ecuación:



La formación de ácido y el consecuente descenso de pH son una manifestación del crecimiento de estos microorganismos.

Los microorganismos hierro-oxidantes catalizan la oxidación de Fe(II) de acuerdo con:



La desaparición de Fe(II) demuestra el crecimiento de este tipo de microorganismos.

El Fe(III) formado puede hidrolizarse generando diferentes fases sólidas (principalmente jarosita y schwertmannita y, en menor medida, goetita y otras) de acuerdo con el pH y con la presencia de distintas especies en solución. En este

proceso, también se generan protones que provocan un descenso del pH. La siguiente ecuación es representativa del proceso de formación de jarosita:



donde M^+ es un catión como K^+ , Na^+ , NH_4^+ o H^+ .

El enriquecimiento SAaSM no mostró disminución de pH lo que sugiere que, probablemente, el azufre no fue significativamente oxidado. Paralelamente, se observó una disminución en la concentración de Fe(II) y, simultáneamente, se apreció la aparición de una fase sólida de coloración marrón-anaranjado que es típica de jarosita. El recuento celular se incrementó rápidamente en las primeras 48 horas; posteriormente, se detectó una disminución progresiva de la población microbiana en suspensión debido a la adhesión sobre los precipitados de hierro presentes (Pogliani & Donati, 2000).

El enriquecimiento ALaSM también mostró una rápida oxidación de Fe(II) y la formación de fases sólidas férricas durante las primeras 24 h que sugieren la presencia de microorganismos hierro-oxidantes. Posteriormente, se observó un descenso significativo de pH alcanzando valores cercanos a 1 luego de 264 h; esta generación de protones parece superior a la que podría producirse por hidrólisis del Fe(III) e indicaría la presencia de microorganismos azufre-oxidantes.

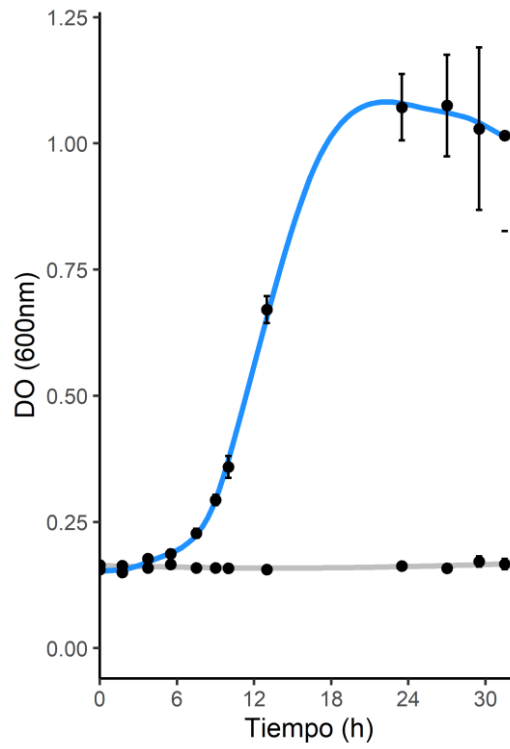


Figura 2.2 – Cinética del cultivo organótrofo de Agua de Limón ALoSM a través de variación de DO 600 nm. En gris se muestra el control abiótico y en azul los cultivos inoculados.

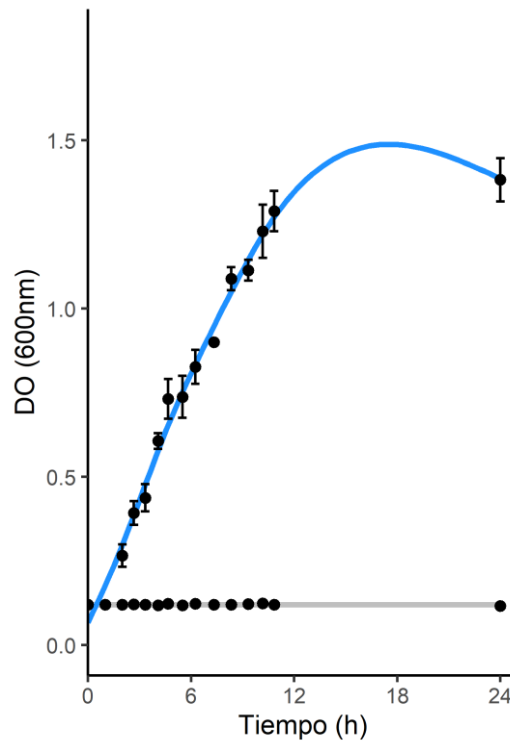


Figura 2.3 – Cinética de crecimiento del consorcio organótrofo aeróbico SAoSM por variación de DO 600 nm. En gris se muestra el control abiótico.

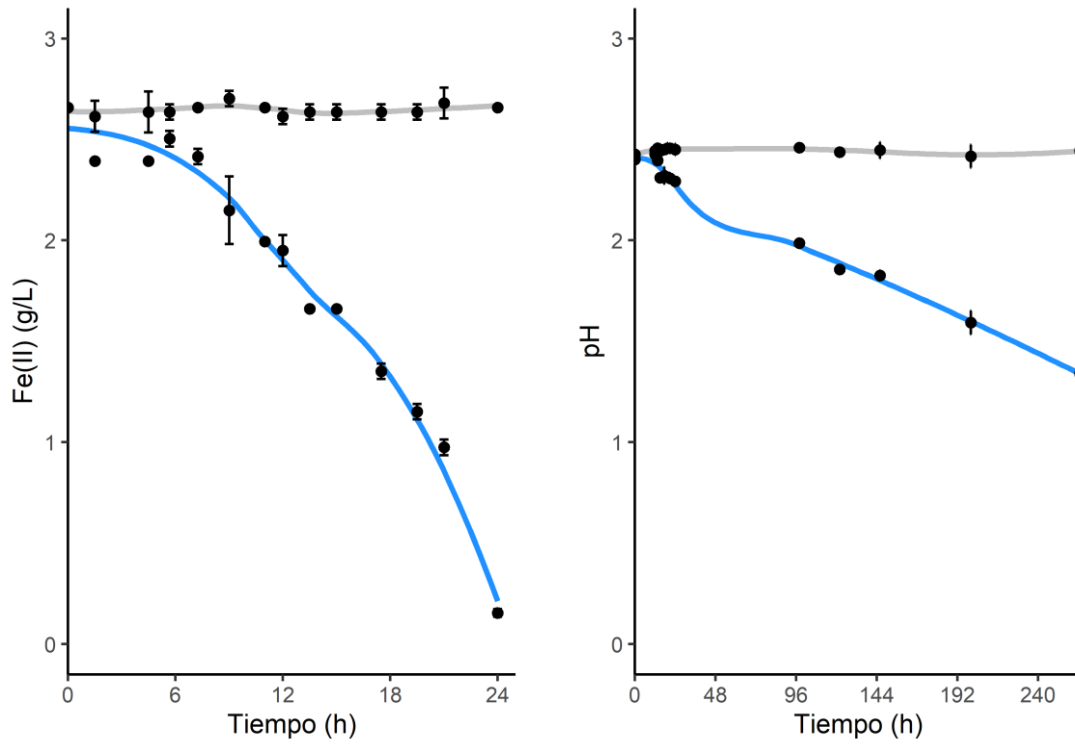


Figura 2.4 – Cinética del consorcio litótrofo de Agua de Limón en medio acidófilo con Fe(II) y S (ALaSM). Concentración de ion ferroso en solución y pH. En gris controles abióticos.

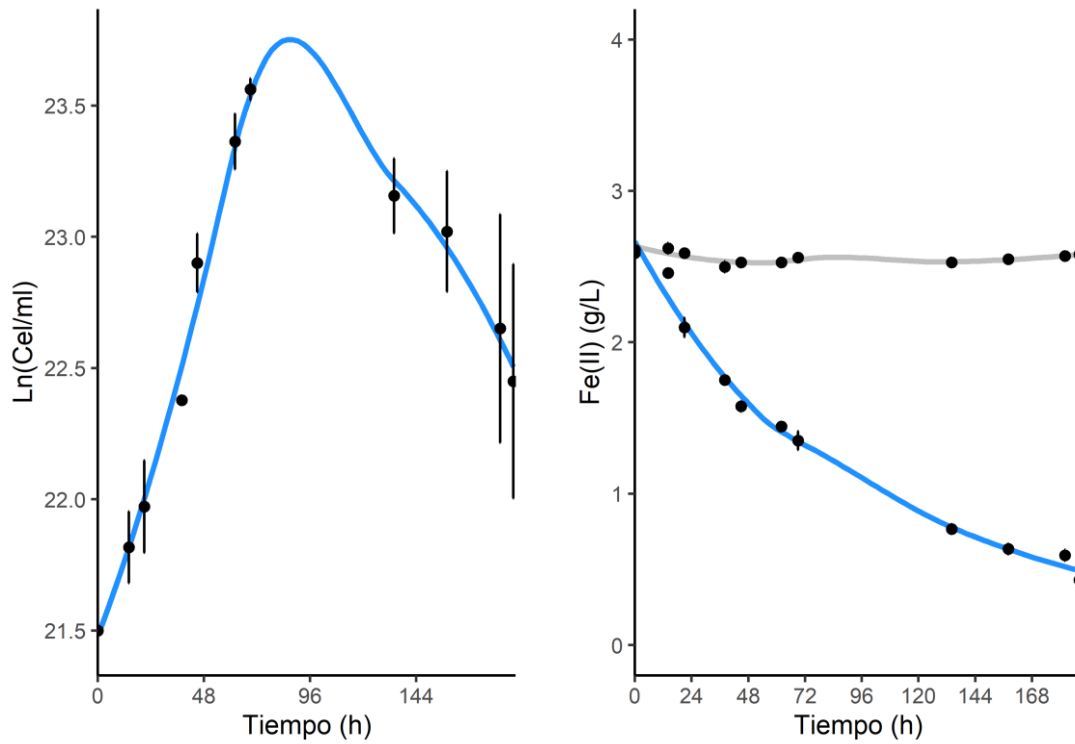


Figura 2.5 - Cinética de crecimiento del consorcio litótrofo acidófilo de Salto del Agrio (SAaSM). Concentración de hierro(II) en solución y recuento celular. En gris se muestra el control estéril.

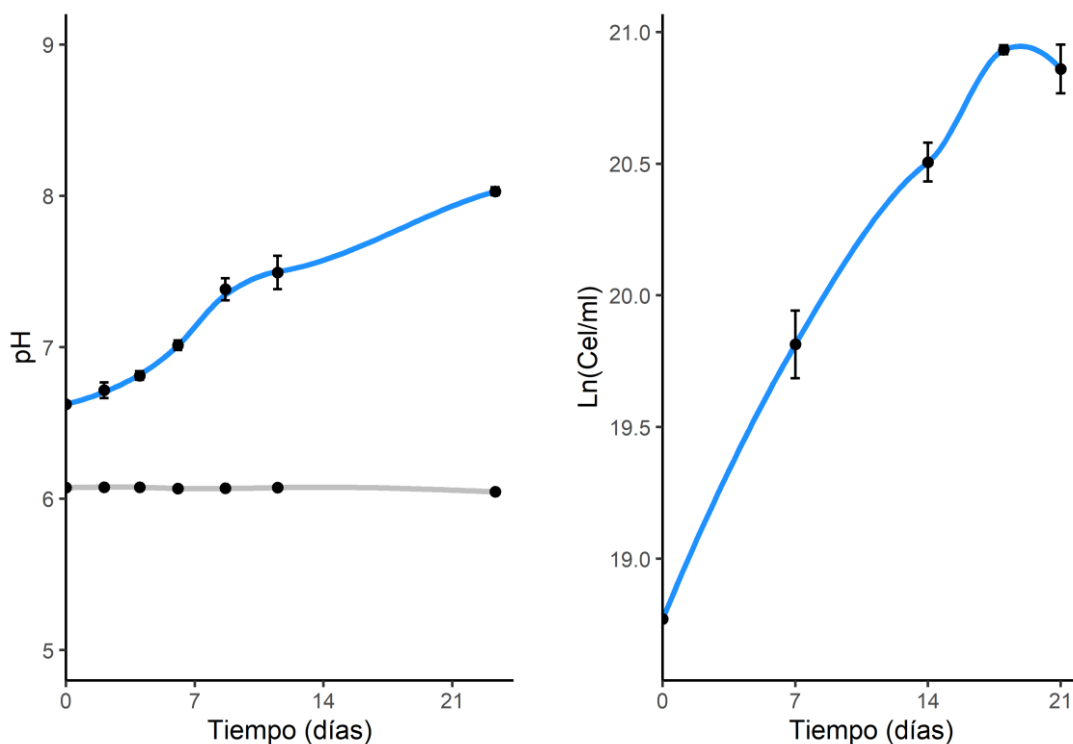


Figura 2.6 – Cinética de crecimiento del cultivo organótrofo anaeróbico de Salto del Agrio (SAnSM). Recuento celular y pH. En gris control abiótico.

A partir de las cinéticas, se establecieron los tiempos necesarios para alcanzar una meseta en el parámetro de crecimiento seleccionado. Los valores determinados fueron: SAoSM, 24 h; SAaSM, 168 h; SAnSM, 21 días; ALoSM, 48 h; ALaSM, 264 h.

Esos tiempos fueron utilizados en la evaluación de tolerancia ante la exposición a metales que se hizo posteriormente. Para ello, los enriquecimientos originales fueron repicados en nuevos medios con distintas concentraciones de metal simulando una aparición repentina de los mismos. En este ensayo sólo se analizó el desarrollo microbiano (que se evaluó como positivo o negativo) luego de transcurrido el tiempo establecido previamente para los enriquecimientos originales.

La **Tabla 2.3** muestra las concentraciones de metal evaluadas para cada uno de los enriquecimientos. En la misma tabla se resaltaron las máximas concentraciones en las que se observó desarrollo microbiano (en naranja para los enriquecimientos SA y en azul para los enriquecimientos AL). Puede observarse

que todos los enriquecimientos mostraron algún grado de tolerancia a todos los metales probados. En algunos casos, se observó crecimiento parcial en concentraciones mayores a la resaltada; no obstante, se reportan sólo aquellas concentraciones en las que el crecimiento fue similar a la del cultivo sin metal al cabo del tiempo establecido.

Tabla 2.3 - Tolerancias de los enriquecimientos tras exposición repentina a metales

Metabolismo	Metal	Concentración en mg/L					
		SA	SA	SA	SA	SA	SA
Acidófilo	Cd	31	100	250	500	1500	3000
	Co	59	92	294	368	736	1767
	Cu	40	159	317	635	1270	3177
	Ni	46	183	367	587	2934	4108
	Zn	51	326	653	817	3269	4576
Organótrofo	Cd	10	25	50	117	238	455
	Co	29	58	175	291	719	1403
	Cu	6	19	38	63	155	302
	Ni	29	58	175	290	405	715
	Zn	32	65	195	323	451	797
Anaeróbico	Cd	10	25	63	125	250	500
	Co	44	88	176	368	736	1473
	Cu	9	19	31	79	158	317
	Ni	14	44	88	190	366	733
	Zn	16	49	98	212	408	817

En naranja las tolerancias para enriquecimientos SA y en azul para enriquecimientos AL.

2.3.3. Tolerancia inducida a concentraciones crecientes de metales

A partir de las tolerancias obtenidas en la exposición abrupta se inició una adaptación progresiva a concentraciones crecientes de los metales. De esta manera se alcanzaron niveles de tolerancia significativamente mayores tal cual muestra la **Tabla 2.4**.

Tabla 2.4 – Tolerancia inducida por exposición a concentraciones crecientes (en mg/L)

Metabolismo	Muestra	Cd	Co	Cu	Ni	Zn
Acidófilo	SA	11241	11787	635	23477	26152
	AL	2248	5893	3177	23477	19614
Organótrofo	SA	112	59	64	293	798
	AL	49	295	159	235	131
Anaeróbico	SA	11	589	13	117	65

El incremento de la tolerancia alcanzada por adaptación progresiva fue especialmente notable en el caso de los acidófilos; en algunos de estos consorcios la tolerancia aumentó hasta tres órdenes de magnitud. Por ejemplo, los consorcios SAaCd y SAaCo, cuyas tolerancias iniciales eran 31 y 92 mg/L respectivamente, por adaptación alcanzaron tolerancias hasta 11 241 mg/L de Cd y 11 787 mg/L de Co. Los enriquecimientos acidófilos de AL incrementaron sus tolerancias en hasta dos órdenes de magnitud; por ejemplo, ALaNi y ALaZn aumentaron su tolerancia desde 587 mg/L hasta 23 477 mg/L de Ni y desde 653 mg/L de Zn hasta 19 614 mg/L, respectivamente. En los otros metabolismos el incremento en tolerancia no fue tan significativo.

En los enriquecimientos SA, la actividad hierro-oxidante fue afectada por el incremento de la concentración de ciertos metales. En cada nueva etapa de adaptación se observó un descenso en la oxidación de Fe(II) y un simultáneo incremento en la población microbiana con preponderancia progresiva de bacilos cortos. Esta observación sugirió que los microorganismos hierro-oxidantes fueron desplazados progresivamente por microorganismos heterótrofos que crecían a expensas del extracto de levadura que se adicionaba en los cultivos.

Debido a ello, se incrementó la concentración del extracto hasta 1 g/L y se continuó con el proceso adaptativo a los metales aun cuando el metabolismo se había modificado significativamente. A partir de ese momento, el crecimiento microbiano fue seguido a través de la población en suspensión. La **Tabla 2.5** siguiente muestra el proceso de adaptación de estos consorcios detallando el tipo de metabolismo observado (columna Act. obs.) para cada concentración de metal probada; se resaltaron en naranja los cultivos en los que se incrementó la cantidad de extracto de levadura.

Tabla 2.5 – Proceso de adaptación en los consorcios acidófilos de SA

[Cd]	Act. obs.	[Co]	Act. obs.	[Cu]	Act. obs.	[Ni]	Act. obs.	[Zn]	Act. obs.
28	Fe ox.	88	Fe ox.	32	Fe ox.	176	Fe ox.	785	Fe ox.
112	Fe ox.	177	Fe ox. *	64	Fe ox. *	352	Fe ox. *	1635	Fe ox.
337	Fe ox.	354	Fe ox. *	318	Fe ox. *	704	Het	3269	Fe ox.
674	Fe ox.	884	Fe ox. *	636	Het	2935	Het	6538	Fe ox.
1124	Fe ox.	1768	Fe ox. *			5869	Het	13076	Fe ox.
2810	Fe ox.	2947	Het			11739	Het	26152	Fe ox.
5621	Fe ox.	5893	Het			23477	Het		
11241	Fe ox.	11787	Het						

Concentraciones de metal en mg/L. Actividad observada (Act. obs.): Hierro-oxidante (Fe ox.), hierro-oxidante disminuida (Fe ox.*) o únicamente heterotrófica (Het). En naranja cultivos con 1 g/L de extracto de levadura.

Algunos consorcios (SAoCu y SAnNi) no fueron capaces de ser repicados de modo satisfactorio incluso a las concentraciones de metales que habían tolerado en la exposición repentina; en esos casos, se redujo la concentración hasta lograr un crecimiento adecuado.

2.3.4. Análisis comparativos

En función de analizar las tolerancias exhibidas para cada metal y para los distintos consorcios, éstos fueron agrupados de acuerdo con su metabolismo, luego, mediante el test de Kruskal-Walis, se determinó si había diferencias en las tolerancias alcanzadas. De ese modo, se verificó que en el caso de la exposición repentina no hubo diferencias significativas entre los metabolismos; es decir, ninguno de los tres metabolismos se mostró más tolerante/susceptible que los otros ante una presencia repentina de metales.

Luego del proceso de adaptación las concentraciones toleradas se incrementaron notablemente. En los consorcios acidófilos este incremento fue, en promedio, de 84 veces, mientras que en los organótrofos aeróbicos las tolerancias se triplicaron en promedio. Así, se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los metabolismos, siendo los consorcios acidófilos más tolerantes por adaptación que los otros dos metabolismos entre los que no se determinaron diferencias (**Fig. 2.7**).

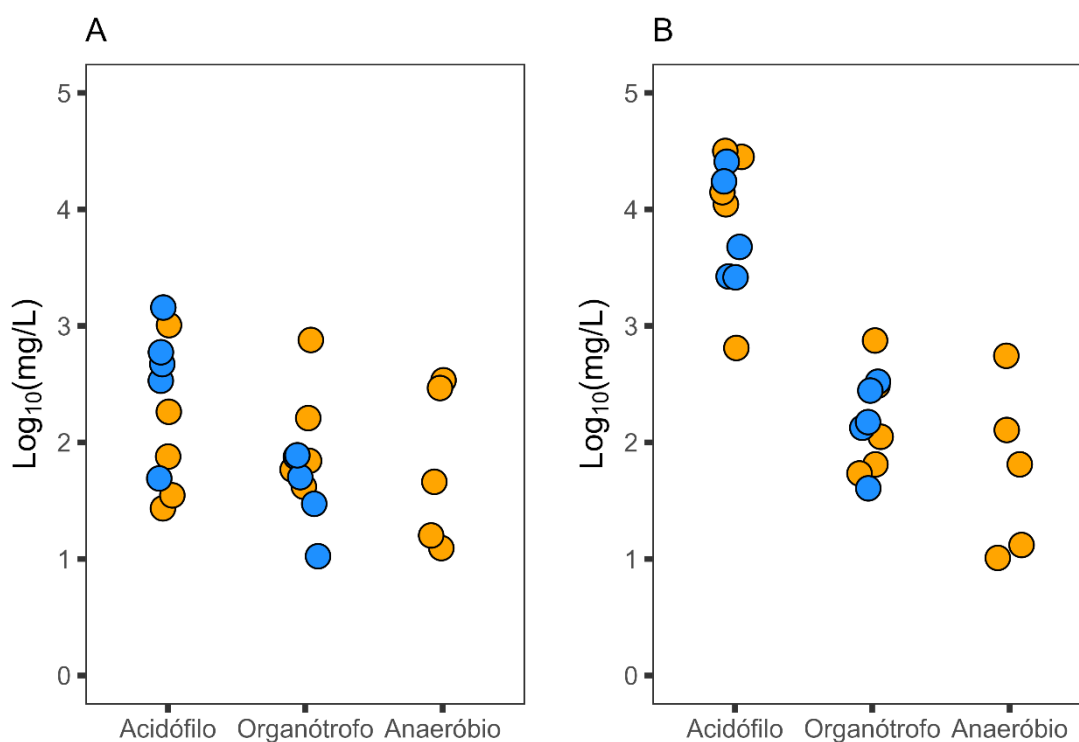


Figura 2.7 – Logaritmo con base 10 de las tolerancias en función del metabolismo del consorcio (A) frente a una exposición repentina, y (B) tras una adaptación progresiva. En azul los consorcios obtenidos a partir de la muestra AL y en naranja los provenientes de la muestra SA

Posteriormente, se realizó un relevamiento bibliográfico para comparar las tolerancias obtenidas en ambos ensayos con los valores reportados en la literatura. La base del relevamiento fue tomada del estudio de Mejias Carpio *et al.* (2018); esta base de datos fue extendida, en particular, para cobalto. De este modo, se obtuvo una recopilación bibliográfica de 631 concentraciones de inhibición (CIM) para poblaciones y consorcios de procariotas tolerantes y resistentes (ver **Anexo II**). En esta base de datos, las medianas de las CIM de cada metal son (en mg/L): cadmio, 84,30; cobalto, 117,87; cobre, 158,85; níquel, 293,45; zinc, 392,28.

En la **Figura 2.8** se muestra en forma de violín las CIM de la base de datos para cada metal, dentro de cada violín se encuentra la distribución de las concentraciones inhibitorias reportados para ese metal en particular. El violín puede interpretarse como una función de densidad de probabilidad para la CIM de cada metal de acuerdo con esta base de datos, donde la región más ancha es la moda de dicha función. El valor de la mediana fue marcado con una cruz. Los puntos indicados sobre el violín corresponden a las tolerancias obtenidas en este trabajo durante el ensayo de exposición abrupta.

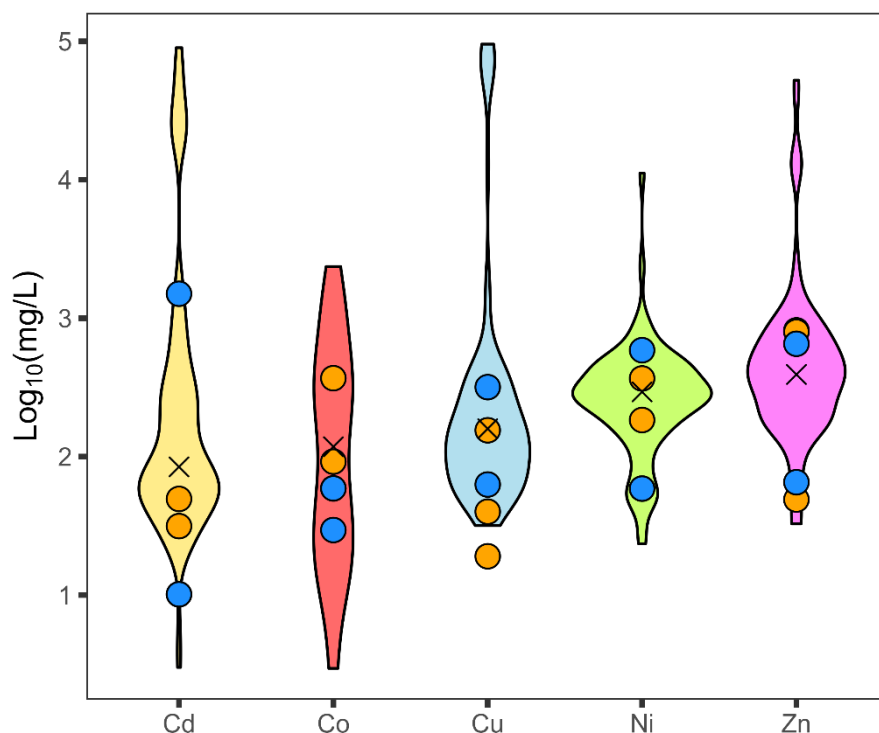


Figura 2.8 – Comparación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) reportadas en bibliografía para los metales estudiados (violín) y las tolerancias exhibidas por los consorcios durante una primera exposición (puntos superpuestos). Los puntos superpuestos en azul corresponden a los consorcios provenientes de AL y en naranja a los de SA. La mediana de la CIM de cada metal se muestra con una cruz sobre cada violín. Las concentraciones se presentan transformadas con la función logaritmo con base 10.

El gráfico permite mostrar que, ante una exposición repentina, los consorcios manifestaron tolerancias del orden de las reportadas para microorganismos resistentes, aun a pesar de que estos metales no fueron determinados en el sitio de muestreo (con excepción de una baja concentración de cobre en AL). Este resultado, que evidencia una importante capacidad de la comunidad autóctona para tolerar metales, responde a la necesidad de adaptación a su entorno actual. No obstante, casi todas las tolerancias exhibidas se ubicaron por debajo de la mediana reportada, es decir, son valores inferiores a los tolerados por la mayoría de los microorganismos y consorcios resistentes.

Posteriormente, se realizó una comparación similar frente a la base de datos analizando los valores de tolerancia obtenidos tras la adaptación progresiva (**Fig. 2.9**) que, como se mencionó anteriormente, fueron mucho más elevados que en la exposición abrupta. En este caso, se encontró que la mayoría

de las tolerancias alcanzadas eran superiores a la mediana reportada. Más aún, muchas concentraciones estaban por encima del violín, es decir, son mucho más elevadas que la CIM de la mayoría de los microorganismos y consorcios resistentes reportados. Este resultado muestra que los consorcios obtenidos en este trabajo tienen una enorme capacidad de adaptación que los hace especialmente tolerantes a los metales pesados.

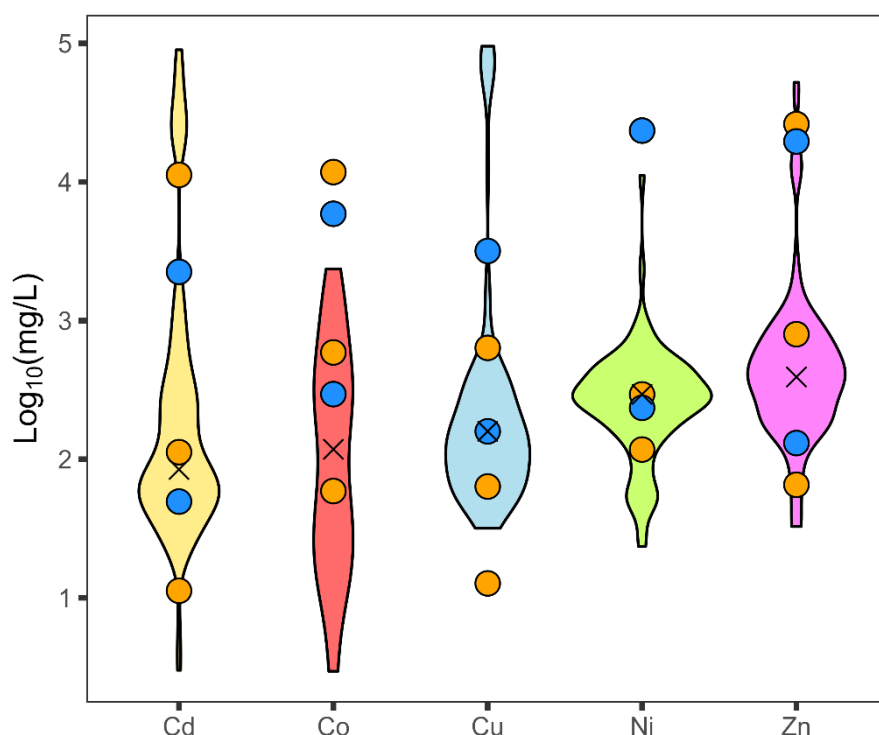


Figura 2.9 – Comparación de las CIM reportadas en bibliografía (violín) y las tolerancias exhibidas por los consorcios tras la adaptación a concentraciones crecientes de los metales estudiados (valores superpuestos). Los puntos superpuestos en azul corresponden a los consorcios provenientes de AL y en naranja a los de SA. La mediana de la CIM de cada metal se muestra con una cruz sobre cada violín. Las concentraciones fueron transformadas con la función logaritmo con base 10.

2.3.5. Cinética de consorcios resistentes

Las cinéticas de crecimiento de los consorcios tolerantes a la máxima concentración alcanzada fueron comparadas con las cinéticas obtenidas para los cultivos sin metal (ver **Anexo III**). Las **Tablas 2.6, 2.7 y 2.8** resumen los parámetros obtenidos.

En los consorcios organótrofos, se calculó la fase *lag* (h) y la velocidad específica de crecimiento (μ) (h^{-1}) a partir de la linealización de la variación de la densidad óptica del cultivo (DO). En la tabla se incluye el valor del coeficiente de determinación (R^2_{ajustado}) de dicha linealización.

En los consorcios litótrofos acidófilos, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) (h^{-1}) a partir del ajuste al modelo teórico (ver **sección 2.2.7**) para el consumo de Fe(II) y la generación de H^+ . En esos casos, se indica el número de iteraciones necesarias (*Iter*) hasta alcanzar la convergencia en los parámetros determinados. Un valor entre 1-10 implica un muy buen ajuste, entre 10-20 un ajuste bueno o moderado, y un número entre 20-50 significa que la cantidad de datos experimentales está en el límite de lo necesario para la complejidad del modelo. Más de 50 iteraciones no aseguran convergencia de los parámetros estimados (Baty *et al.*, 2015). En la tabla se agregó el tiempo final de la determinación (tF) (h). Para la cinética de oxidación de Fe(II), se indica el tiempo al que la concentración del ion en solución fue cero, mientras que en la cinética de generación de protones se indica el tiempo transcurrido hasta que el pH alcanzó el valor 1 o, en su defecto, cuando se alcanzó el tiempo final establecido (ver **sección 2.3.2**). En los consorcios litótrofos de SA se determinó también la concentración de células en el cultivo. A partir de la linealización de esta medida se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) (h^{-1}) y la fase *lag* (h).

No fue posible calcular parámetros de crecimiento en los consorcios organótrofos anaeróbicos dada la formación de precipitado y la adhesión de microorganismos a ellos (Sheng *et al.*, 2007 y 2008); en cambio, se presentan los valores del recuento de células al microscopio para el tiempo inicial ($[X]_0$) y al cabo de 21 días ($[X]_t$), así como también los valores de pH.

Tabla 2.6 – Parámetros de crecimiento de consorcios organótrofos aeróbicos

Consortio	DO (600 nm)		
	Lag (h)	μ (h ⁻¹)	R ² adj
SAoSM	0,58	0,468	0,93
SAoCd	2,29	0,177	0,97
SAoCo	2,21	0,187	0,99
SAoCu	1,99	0,200	0,99
SAoNi	2,75	0,094	0,96
SAoZn	1,07	0,140	0,97
ALoSM	5,16	0,173	0,97
ALoCd	14,36	0,088	0,97
ALoCo	16,58	0,065	0,98
ALoCu	13,42	0,110	0,96
ALoNi	9,78	0,144	0,99
ALoZn	8,67	0,096	0,99

Tabla 2.7 – Parámetros de crecimiento de consorcios litótrofos acidófilos

Consortio	Generación de H ⁺			Consumo de Fe(II)			[Células/mL]		
	tF (h)	μ (h ⁻¹)	I _{ter}	tF (h)	μ (h ⁻¹)	I _{ter}	Lag(h)	μ (h ⁻¹)	R ² adj
SAaSM	-	-	-	ND	0,013	12	3,42	0,031	0,97
SAaCd	-	-	-	168,0	0,008	15	5,86	0,055	0,98
SAaCo	-	-	-	-	-	-	3,20	0,056	0,90
SAaCu	-	-	-	-	-	-	4,76	0,054	0,98
SAaNi	-	-	-	-	-	-	8,60	0,031	0,96
SAaZn	-	-	-	98,0	0,086	6	3,12	0,114	0,93
ALaSM	265,0	0,009	8	24,0	0,070	5	ND	ND	ND
ALaCd	119,5	0,008	8	120,0	0,025	11	ND	ND	ND
ALaCo	125,0	0,010	7	-	-	-	ND	ND	ND
ALaCu	184,0	0,001	8	71,5	0,061	10	ND	ND	ND
ALaNi	142,5	0,013	6	48,0	0,047	8	ND	ND	ND
ALaZn	-	-	-	28,5	0,040	6	ND	ND	ND

*Los guiones (-) indican que no se observó variación en el parámetro a lo largo de la cinética. ND indica que no se determinó ese parámetro en el ensayo.

Tabla 2.8 – Variación de parámetros de crecimiento en consorcios organótrofos anaeróbicos

Consortio	[Células/mL]		pH	
	[X] ₀	[X] _f	pH ₀	pH _f
SAnSM	1,25x10 ⁸	1,04x10 ⁹	6,93	6,78
SAnCd	6,40x10 ⁷	2,30x10 ⁸	6,93	6,56
SAnCo	5,65x10 ⁷	2,88x10 ⁸	7,13	6,93
SAnCu	1,25x10 ⁷	2,85x10 ⁸	6,35	6,22
SAnNi	2,90x10 ⁷	8,30x10 ⁸	6,95	6,93
SAnZn	1,25x10 ⁷	3,90x10 ⁸	6,87	6,22

*Valores a tiempo inicial (0) y tiempo final (t), que en todos los casos fue 21 días.

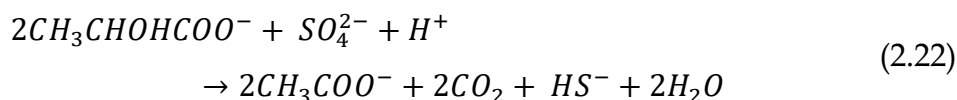
En los consorcios organotróficos expuestos a metal, tanto provenientes de SA como de AL, se observó una mayor fase *lag* y una menor velocidad de crecimiento (μ); los dos parámetros fueron afectados en un factor de entre 2 y 4 veces respecto al valor del consorcio sin metal (SAoSM y ALoSM). Un caso particularmente interesante es el consorcio SAoNi que mostró un fuerte impacto en su crecimiento debido a la presencia del metal: su fase *lag* fue 7 veces más extendida que la del cultivo sin metal (4,07 h y 0,58 h, respectivamente) y su velocidad de crecimiento fue 4 veces inferior (0,1123 h⁻¹ y 0,4683 h⁻¹, respectivamente).

Los consorcios acidófilos SA no mostraron una clara actividad azufre-oxidante en ninguno de sus consorcios. La actividad hierro-oxidante fue observada en el enriquecimiento original (SAaSM) y en los consorcios expuestos a cadmio y zinc, pero esa capacidad metabólica fue perdida en los otros consorcios. Cuando esa capacidad fue perdida, y tal cual se mencionó previamente, probablemente los microorganismos predominantes fueron acidófilos heterótrofos que mostraron muy altas tolerancias a cobalto, cobre y níquel. Un hecho interesante es que, a pesar del cambio en las capacidades metabólicas, la cinética de crecimiento de estos tres consorcios acidófilos heterótrofos seguida a través de recuento celular no mostró una fase *lag* ni una velocidad de duplicación diferente a la del enriquecimiento original no expuesto a metales. En cambio, el consorcio expuesto a zinc (SAaZn) presentó una fase *lag*

menor estimada tanto desde la actividad hierro-oxidante como desde el recuento celular y velocidades de oxidación y duplicación mayores a las del enriquecimiento original.

Los consorcios AL mostraron actividad hierro-/azufre-oxidante. En este caso, los comportamientos de cada consorcio fueron particulares y diferentes entre sí. En general, la acidificación del medio (indicador de la actividad azufre-oxidante) se inició temprano en el cultivo, mientras que la actividad hierro-oxidante mostró una fase *lag* más extendida. Una excepción fue el consorcio ALaCu que exhibió una primera actividad hierro-oxidante y una tardía acidificación (52 h). Debido a que esta acidificación fue posterior a la producción de Fe(III), no resulta posible discernir si se debe a la oxidación del azufre elemental o a la hidrólisis del hierro-oxidado que genera fases sólidas (**ec. 2.26** para el caso de la formación de jarosita).

Tal como se indicó previamente, el crecimiento de los consorcios anaeróbicos fue seguido por recuento de células. La actividad sulfato-reductora en presencia de lactato es descrita por la **ec. 2.22** (se repite debajo para simplificar su acceso):



Los sulfuros de muchos metales de transición (entre ellos, los usados en este estudio) presentan solubilidades muy bajas ($\text{pK}_{\text{ps}} > 20$) y, debido a ello, tiene lugar el siguiente proceso (**ec. 2.27**):



En todos los consorcios se constató el aumento de la cantidad de células en al menos un orden de magnitud tras 21 días (**Tabla 2.8**). En estos cultivos se verificó la aparición de compuestos insolubles y se detectó H_2S gaseoso a través de su olor característico; una excepción fue el cultivo del consorcio SAnZn donde no fue posible confirmar la presencia de precipitado, aunque el color del sulfuro de zinc es blanco y su detección algo más dificultosa en este medio de cultivo.

Los datos recolectados en los cultivos anaeróbicos no fueron suficientes para construir curvas de crecimiento apropiadas para el cálculo de los parámetros típicos (fase *lag* y velocidad de duplicación); la principal dificultad fue la alta capacidad de estos microorganismos para adherirse al precipitado formado y provocar, consecuentemente, una subestimación de la biomasa formada cuando se determina solo la población celular en suspensión.

2.3.6. Concentración de metal soluble

Se analizaron las concentraciones de los metales al inicio y al final del cultivo de cada consorcio tolerante en función de observar cambios que revelaran tanto posibles reacciones químicas del metal con el medio de cultivo como potenciales mecanismos microbianos de resistencia a los metales.

La **Tabla 2.9** incluye las concentraciones de metal (en mg/L) obtenidas al inicio y al final de cada cultivo, la diferencia entre estos valores (Δ), su respectivo error propagado (ΔDE) (es decir, la suma de los errores de los triplicados) y la diferencia relativa porcentual respecto a la concentración inicial (ΔR). Para analizar estos valores, se comparó con la diferencia de concentración observada en los controles abióticos (en la tabla sólo se muestra la diferencia entre la concentración inicial y final en los controles y el error propagado). Por último, se indica el p-valor correspondiente al test t de Student obtenido al analizar esas dos diferencias (en negrita las filas cuyos p-valores fueron menores a 0,05).

Es importante considerar que las determinaciones de las concentraciones en este estudio presentaron un error significativo debido fundamentalmente a las diluciones necesarias para poder realizar las medidas en el espectrofotómetro de absorción atómica. Aun así, en base a las concentraciones determinadas en los controles, se descartaron posibles reacciones con el medio que disminuyeran la fracción disponible.

Tabla 2.9 – Concentraciones de metal al inicio y al final del crecimiento microbiano

	Cultivo					Control		p-Val
	[C] Inicial	[C] Final	Δ	Δ DE	Δ R	Δ	Δ DE	
SAoCd	107	93	14	3	13%	-3	2	0,004
SAoCo	54,3	56	-2	4	-3%	-1	2	0,814
SAoCu	60,9	61	0	3	-1%	0	1	0,768
SAoNi	261	296	-35	19	-14%	-22	45	0,660
SAoZn	732	700	32	15	4%	-12	17	0,026
SAaCd	16142	15465	678	1018	4%	58	353	0,406
SAaCo	13194	13158	36	869	0%	-277	819	0,674
SAaCu	652	647	4	13	1%	1	9	0,754
SAaNi	25429	26109	-680	987	-3%	-1026	527	0,628
SAaZn	32089	28847	3243	2085	10%	-458	1717	0,079
SAnCd	10,5	6,6	3,9	0,0	37%	-0,1	0,0	0,000
SAnCo	569,5	318,8	250,7	0,3	44%	-94,6	0,1	0,000
SAnCu	9,6	1,6	7,9	0,1	83%	0,4	0,2	0,000
SAnNi	119,2	112,0	7,2	0,0	6%	3,5	0,0	0,000
SAnZn	60,5	63,3	-2,8	0,0	-5%	-5,8	0,0	0,000
ALoCd	55	55	-1	3	-1%	0	3	0,772
ALoCo	301	309	-8	66	-3%	-2	16	0,906
ALoCu	148	147	0	17	0%	0	11	0,966
ALoNi	236	226	10	12	4%	-19	16	0,069
ALoZn	146	150	-4	6	-2%	-5	14	0,892
ALaCd	2572	2605	-33	62	-1%	-12	47	0,669
ALaCo	5707	5806	-99	466	-2%	55	740	0,778
ALaCu	3641	3600	42	617	1%	-299	812	0,596
ALaNi	23485	24208	-722	1326	-3%	-1479	888	0,464
ALaZn	20164	19622	542	1215	3%	-412	921	0,344

Respecto al comportamiento en los consorcios, se observó que, para ciertos consorcios, la concentración del metal disminuyó significativamente al tiempo final (filas con p-valor menor a 0,05). Este fenómeno quedaría justificado por la aparición de precipitados, en particular, para los consorcios anaeróbicos. En este sentido, se destacan el consorcio SAnCo, en cuyo cultivo la concentración de cobalto disminuyó en más de 250 mg/L (44%) coincidente con la aparición de un precipitado negro, y el consorcio SAnCu donde la concentración de cobre disminuyó en casi 8 mg/L (83%) y que podría justificar la aparición de un precipitado verde/marrón. Los consorcios organótrofos, SAoCd y SAoZn, disminuyeron la concentración en 13 mg/L (13%) de cadmio y en 32 mg/L (4%) de zinc, respectivamente. En estos casos, aunque no fue evidente la formación de precipitado, se observaron cambios en la viscosidad del medio que podrían estar vinculados con la presencia de sustancias poliméricas extracelulares que pueden complejar y retener parte de los iones metálicos en su estructura.

2.3.7. Análisis de precipitados

Los precipitados obtenidos en los consorcios anaeróbicos, con excepción del consorcio SAnZn (que no mostró precipitado cristalino), fueron analizados por EDX (las imágenes pueden verse en las **Figuras 2.10, 2.11, 2.12 y 2.13**). Los resultados obtenidos se incluyen en las **Tablas 2.10, 2.11, 2.12 y 2.13**. En todos los análisis, se detectó carbono proveniente de la película conductora con la que se cubren las muestras.

En los consorcios SAnCo y SAnNi, la relación de átomos del metal y de azufre en el precipitado fue muy cercana a 1:1, sugiriendo que el sólido tenía una composición cercana al sulfuro estequiométrico. En los consorcios SAnCu y SAnCd, las relaciones (Cu:S 3:1, Cd:S 2:1) resultaron alejadas de las correspondientes a los sulfuros estequiométricos. La coloración de los precipitados (marrón verdoso y amarillo, respectivamente) sugiere la presencia cobre y cadmio en las fases sólidas, respectivamente. Es probable, aunque no pudo ser determinado claramente, que las fases sólidas incluyeran compuestos básicos y fosfatos de los metales correspondientes (coincidente con la presencia de fósforo y oxígeno en el precipitado).

En las imágenes de SEM se observan muchos microorganismos adheridos sobre el precipitado y, en algunos casos, como en el proveniente del cultivo del consorcio SAnCd (**Fig. 2.10**), se puede observar un biofilm.

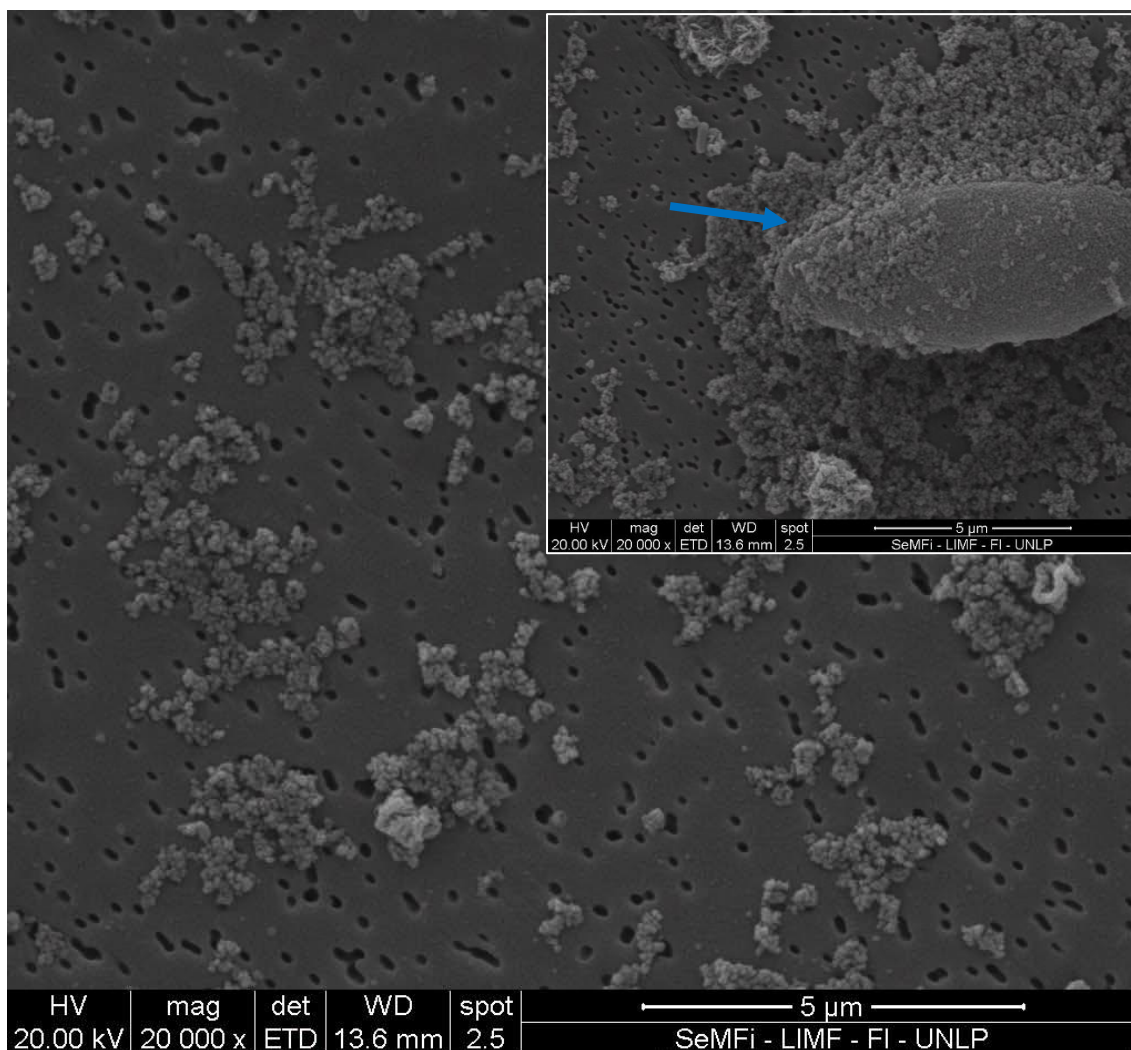
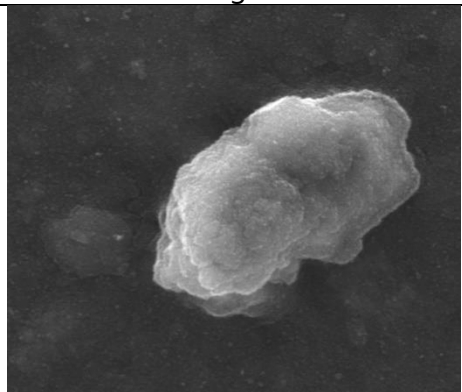


Figura 2.10 – Imagen SEM del consorcio SAnCd. En el cuadro superior derecho se muestra un biofilm de bacterias sobre una partícula (flecha).

Tabla 2.10 – Composición de precipitado (imagen) el cultivo SAnCd

Imagen	Elemento	Masa %	Átomos %
		C K	51,17
	O K	16,16	16,52
	Na K	0,95	0,68
	Mg K	0,43	0,29
	Al K	0,84	0,51
	P K	8,65	4,61
	S K	1,03	0,53
	Cd L	7,72	1,13
	Ca K	13,04	5,36

Technical data for the precipitate image:
 HV: 20.00 kV | mag: 12 000 x | det: ETD | WD: 10.7 mm | spot: 4.5
 Scale bar: 10 µm
 SeMFI - LIMF - FI - UNLP

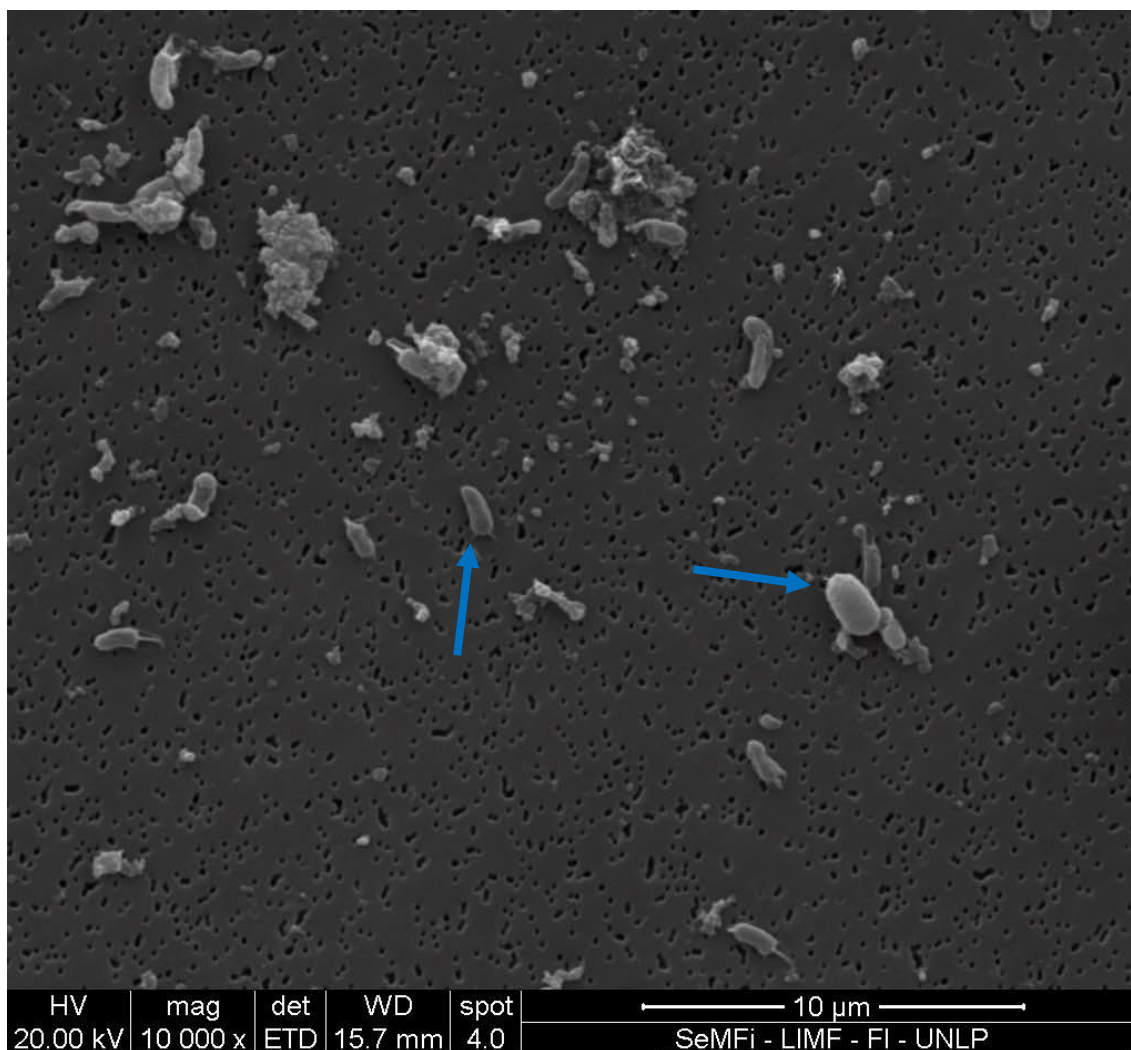


Figura 2.11 – Imagen SEM del consorcio SAnCo. Con flecha azul se indican microorganismos.

Tabla 2.11 – Composición de precipitado (imagen) del cultivo SAnCo

Imagen	Elemento	Masa %	Átomos %
	C K	24,10	47,59
	O K	13,68	20,28
	Si K	0,35	0,29
	P K	0,50	0,38
	S K	20,03	14,82
	Co K	41,35	16,64

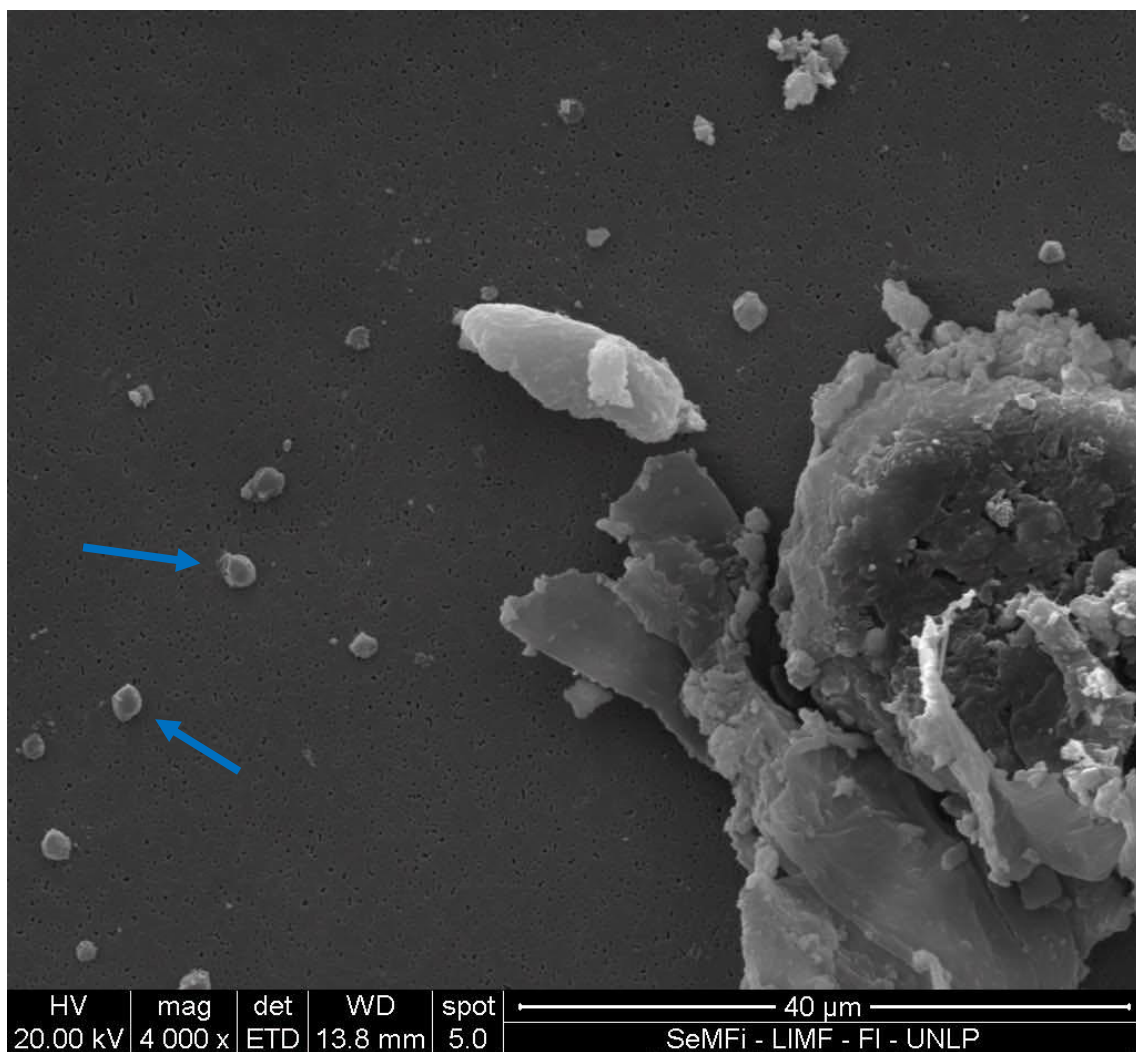
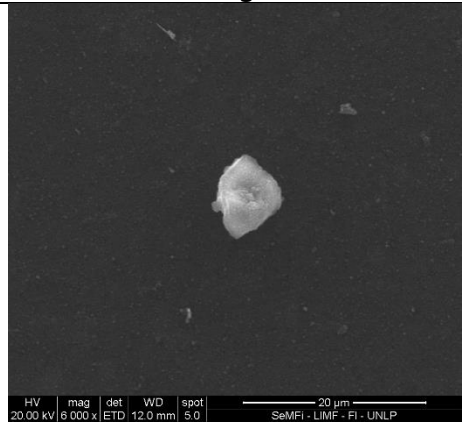


Figura 2.12 – Imagen SEM del consorcio SAnCu. A la derecha partículas precipitadas, con flechas se indican microorganismos del tipo coco.

Tabla 2.12 – Composición de precipitado del cultivo SAnCu

Imagen	Elemento	Masa %	Átomos %
		C K	71,67
	O K	16,24	13,84
	Cu L	3,78	0,81
	Mg K	0,86	0,48
	Si K	6,37	3,09
	S K	0,65	0,27
	K	0,43	0,15

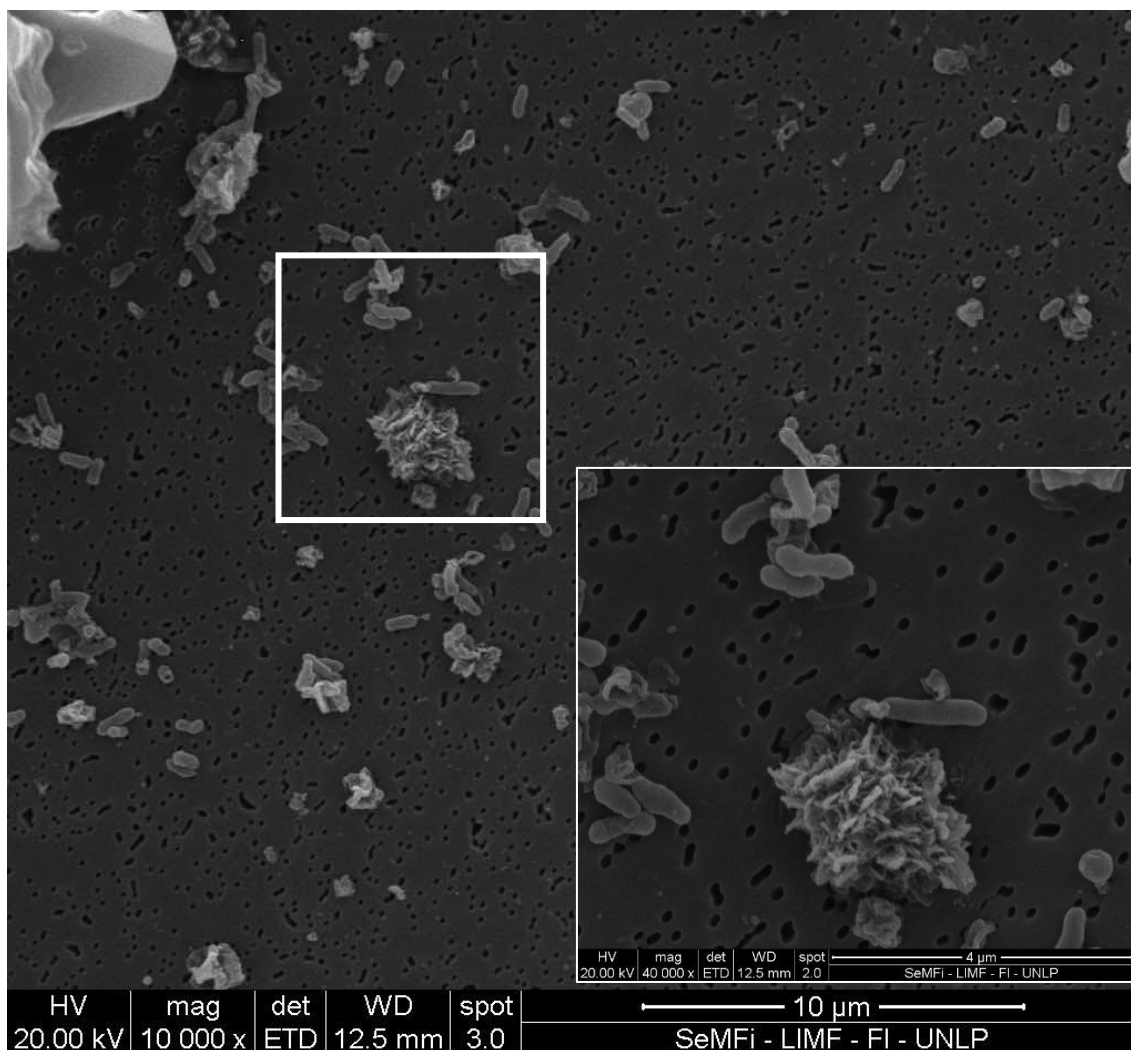


Figura 2.13 – Imagen SEM del consorcio SAnNi. La zona ampliada muestra una partícula y microorganismos del tipo bacilo.

Tabla 2.13 – Composición de precipitado del cultivo SAnNi

Imagen	Elemento	Masa %	Átomos %
	C K	49,61	77,19
	O K	2,51	2,93
	Mg K	0,14	0,11
	Si K	0,17	0,11
	S K	17,07	9,95
	Fe K	0,19	0,06
	Ni K	30,30	9,64

2.4. **DISCUSIÓN**

Los metales pesados representan un riesgo ambiental, tanto durante su extracción como en su descarte y acumulación, debido a la elevada toxicidad que presentan y a la imposibilidad de ser degradados. Las regiones extremófilas geotermales, donde la concentración de los metales en aguas y sedimentos frecuentemente fluctúa en el tiempo, son propicias para estudiar **cuál es el efecto que tiene la presencia de estos compuestos sobre las comunidades microbianas autóctonas**. Estos ambientes son también nichos adecuados para la **búsqueda de microorganismos resistentes con potencial para ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas** vinculadas con la recuperación y la remediación de metales.

En este trabajo se estudió la región geotermal de Caviahue-Copahue que está ubicada sobre la Cordillera de los Andes en la provincia de Neuquén, Argentina. La naturaleza de la región está definida por la actividad del volcán Copahue, determinando un ambiente extremo y de condiciones que pueden variar rápidamente. Varekamp *et al.* (2009) estudiaron la dinámica de este ambiente a lo largo de un periodo de ocho años, demostrando que la presencia o ausencia de un determinado compuesto varía significativamente de un período a otro. Esta característica implica que la comunidad autóctona debe ser versátil, tanto en su capacidad de resistir diversos estreses como en su adaptabilidad a los cambios en el ambiente. A su vez, cabe esperar la sustitución y la prevalencia de distintas especies a lo largo del tiempo en consonancia con la evolución de las condiciones. A lo largo de los años, la región ha sido extensamente estudiada por este y otros grupos de investigación focalizándose en su naturaleza fisicoquímica (Panarello, 2002; Varekamp, 2004; Gammons *et al.*, 2005; Varekamp *et al.*, 2009; Pedrozo *et al.*, 2010) y ecológica (Lavalle *et al.*, 2005; Chiacchiarin *et al.*, 2010; Willis *et al.*, 2013; Urbietta *et al.*, 2014; Urbietta *et al.*, 2015a; Urbietta *et al.*, 2015b; Willis *et al.*, 2019; Lopez Bedogni *et al.*, 2020) así como también en su potencial biotecnológico (Giaveno *et al.*, 2013; Urbietta *et al.*, 2015c; Castro & Donati, 2016; Cavello *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019; Urbietta *et al.*, 2021). La variación de las condiciones y de las comunidades microbianas presentes se manifiesta en los

resultados obtenidos en campañas de muestreo realizadas en distintos años e incluso en distintos momentos dentro de un mismo año.

Las muestras de los dos sitios –seleccionados de acuerdo con sus condiciones fisicoquímicas y características– se recolectaron en febrero de 2015. Agua de Limón (AL) es un área de manifestaciones geotermales (*hotsprings*) ubicada a 10 km del volcán Copahue en las afueras de la villa homónima. Aquí se evidencia la gran variabilidad de la región como demuestra la permanente modificación de la ubicación espacial de los *hotsprings*; en ocasiones, como en la campaña de muestreo realizada en febrero de 2019, se observaron nuevos *hotsprings* quedando los antiguos secos o inactivos. Durante el muestreo en que se basa este trabajo de tesis, se registraron en diversos puntos del sitio temperaturas entre 45°C y 75°C con valores de pH cercanos a 2. El *hotspring* específicamente seleccionado para los enriquecimientos posteriores presentó una temperatura de 44,8°C y pH 2,09, bajo condiciones reductoras ($E_h = -85,7$ mV) y con presencia de arsénico (0,05 mg/L) y sulfuro disuelto (0,35 mg/L). Posteriormente, se determinó que, de los metales pesados estudiados en este trabajo, sólo había cobre en una baja concentración (0,66 mg/L).

El otro sitio muestreado fue Salto del Agrio (SA), una gran cascada del Río Agrio Inferior de más de 60 metros de altura. El Río Agrio nace en la ladera del volcán Copahue y tiene la particularidad de ser naturalmente ácido, condición que comparten muy pocos ambientes en el mundo. El Río Agrio desciende con pH entre 0 y 2,5 y temperaturas entre 20°C y 70°C recibiendo diversos afluentes hasta desembocar en el lago Caviahue. Al atravesar el lago Caviahue, el pH aumenta hasta valores cercanos a 3, en estas condiciones muchos cationes metálicos forman compuestos insolubles, en particular, el catión férrico que se hidroliza y se acumula en la ribera y en el lecho confiriendo un color anaranjado-rojizo al paisaje. La cascada denominada Salto del Agrio se encuentra aproximadamente 10 km río abajo del lago Caviahue y a 20 km del volcán. Durante la campaña de muestreo se midieron *in-situ* los parámetros tanto del sedimento como del cauce. El sedimento poseía pH de 4,18 y temperatura de 16,7°C con potencial levemente reductor (-25,0 mV). El cauce del río presentaba

pH y temperatura poco menor (3,66 y 15,5°C), mostrando condiciones aeróbicas (Eh = 368,8 mV) y presencia de sulfuro (0,03 mg/L). Estos valores son coherentes con los registrados históricamente en esta región (Urbieta, 2013). En este sitio, todos los metales de interés para este trabajo se encontraban por debajo del límite de detección.

Los enriquecimientos de las dos muestras se hicieron a partir de la selección de metabolismos con interés en procesos biotecnológicos de biorremediación y biominería. Los microorganismos organótrofos aeróbicos, con capacidades funcionales adecuadas, pueden ser utilizados en el tratamiento de efluentes residenciales en donde existe una muy alta carga de carbono (Cai *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015). Además, algunos de estos microorganismos producen gran cantidad de exopolisacáridos (EPS) que han mostrado capacidad biosorbente de metales pesados (Gupta & Diwan, 2017). Los microorganismos litótrofos acidófilos y, en particular, aquellos con actividad hierro/azufre-oxidante, son utilizados en diversos desarrollos de biolixiviación y biooxidación de minerales de baja ley como alternativa a la minería convencional (Rawlings & Johnson, 2007; Johnson, 2013). Además, estos microorganismos son los responsables de la generación de drenajes ácidos de mina (Johnson, 2003; Hallberg & Johnson, 2003; Akcil & Koldas, 2006) que impactan negativamente en los ambientes explotados y que son un serio riesgo no sólo ecológico sino también para la salud de las poblaciones cercanas; estas razones hacen necesarios los estudios para comprender los fenómenos de su generación, así como prevenir, monitorear y tratar los drenajes ya producidos. Por último, los microorganismos anaeróbicos y, en especial, los sulfato-reductores, tienen relevancia en procesos de inmovilización de metales durante el tratamiento de efluentes contaminados, ya que generan sulfuros que precipitan los metales facilitando su separación del seno del líquido (Appels *et al.*, 2008 y 2011; Li *et al.*, 2018; Rambabu *et al.*, 2020).

En un proceso de enriquecimiento en batch, el medio y las condiciones de cultivo seleccionadas provocan inevitablemente un sesgo en el consorcio generado ya que favorecen sólo un grupo determinado dentro de una comunidad microbiana compleja. Debido a ello, los consorcios obtenidos en este estudio a

través del proceso de enriquecimiento son una visión muy parcial y limitada de la comunidad original. Aunque esto resulta inevitable, en función de los objetivos de la tesis, los medios y las condiciones seleccionadas se mantuvieron amplias para darle la mayor diversidad posible al consorcio establecido de modo que tuviera una mayor flexibilidad ante el impacto de los metales con los que se los enfrentó posteriormente.

El enriquecimiento bajo condiciones anaeróbicas de la muestra de AL tuvo un desarrollo microbiano inicial que no mantuvo continuidad posterior. Esto ocurrió en los dos medios utilizados: PgF y Postgate B. En experiencias anteriores se habían logrado consorcios anaeróbicos, pero siempre en medios ácidos (Willis *et al.*, 2019), por lo que se supone que, en esta muestra de baja biodiversidad (como se verá en el próximo capítulo), la condición del pH resulta limitante.

Respecto a la muestra SA, en todos los medios utilizados se obtuvo crecimiento rápido y abundante, observándose al microscopio una gran diversidad de microorganismos. En el caso del metabolismo litótrofo acidófilo, se observó actividad hierro-oxidante pero no actividad azufre-oxidante; este resultado se corresponde con las condiciones del ambiente ya que la presencia de azufre, abundante en el Río Agrio Superior, es bastante escasa en el Río Agrio Inferior, mientras que la concentración de hierro soluble es aún considerable.

Al ser expuestos a la presencia abrupta de metales, todos los consorcios mostraron crecimiento positivo. Las concentraciones máximas toleradas no fueron excesivamente elevadas, aunque, aun así, resultaron sorprendentes ya que los metales no estaban presentes en los ambientes muestreados (salvo cobre, en concentración muy baja, en AL). Esta tolerancia pudo haber sido desarrollada previamente ya que, como mencionan Varekamp *et al.* (2009), los metales que se estudiaron en este trabajo han estado presentes en otros momentos y con concentraciones fluctuantes a lo largo del tiempo. De todos modos, el crecimiento microbiano positivo frente a una exposición abrupta a los cinco metales remarca la naturaleza poli-resistente y versátil de esta comunidad extremófila.

Luego, los consorcios obtenidos fueron adaptados a concentraciones crecientes de los mismos metales con el fin de seleccionar microorganismos resistentes. Este proceso suele conocerse como de tolerancia inducida y está demostrado que de esta manera es posible alcanzar niveles de tolerancia muy superiores a los iniciales (Blanck *et al.*, 1998; Rutgers *et al.*, 1998; Diaz-Raviña & Bååth, 1996). Este aumento de la tolerancia se debe no sólo a la selección y adaptación de aquellas especies originalmente resistentes, sino también a mecanismos de transferencia horizontal de genes y plásmidos de resistencia que *sociabiliza* las capacidades dentro de una comunidad (Bruins *et al.*, 2000).

Los conceptos de *tolerancia* y *resistencia* suelen ser conflictivos y, muchas veces, ambiguos ya que su definición está centrada en el comportamiento microbiano frente a compuestos medicinales (principalmente antibióticos). Brauner *et al.* (2016) han revisado estos conceptos y definen la resistencia como la capacidad de un microorganismo de crecer frente a concentraciones elevadas de un compuesto sin importar la duración de la exposición. La resistencia puede describirse con el valor métrico de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y debe tener asociado un mecanismo genético *heredado* y conocido. Es decir, la resistencia se expresa. Por otro lado, la tolerancia es entendida como la habilidad *transiente* de un microorganismo para sobrevivir a la presencia de un compuesto. En general, la tolerancia se fundamenta en una disminución en la actividad metabólica sin involucrar necesariamente mecanismos específicos que inhiban o degraden al compuesto en cuestión. En un sentido ambiental, el análisis es más complejo, no sólo porque las concentraciones de los compuestos rara vez son estables, sino porque existe la posibilidad de que las condiciones fisicoquímicas o la actividad de otros organismos disminuyan considerablemente la fracción biodisponible de la especie tóxica (Christiansen *et al.*, 2011). Por esta razón, el término *tolerancia* suele emplearse con mayor frecuencia y resulta más adecuado en estudios de ecotoxicología cuando se observa un crecimiento microbiano en presencia de un contaminante sin confirmación sobre la existencia de un mecanismo de resistencia específico.

En función de estas definiciones, el primer ensayo de exposición a metales podría evidenciar la tolerancia de la comunidad, ya que se trató de una exposición corta de una única dosis sin repique. En estas condiciones, la interacción del catión metálico con el medio de cultivo y/o la actividad de ciertos microorganismos podrían disminuir la biodisponibilidad del metal lo suficiente como para que algunos otros microorganismos, aun sin poseer un mecanismo específico de resistencia, se desarrollen o, al menos, se mantengan viables. Sin embargo, la tolerancia no puede ser muy elevada ya que los microorganismos no contaban con la maquinaria genética de resistencia expresada al momento de la exposición abrupta, siendo susceptibles al estrés oxidativo.

Al realizar una adaptación progresiva, y frente a un incremento gradual de la concentración del tóxico (metal, en este caso), los microorganismos tienen la posibilidad de expresar la maquinaria de resistencia necesaria (de poseerla). Posteriormente, la selección progresiva de estos microorganismos resistentes, junto con una eventual transferencia horizontal de genes, permitiría obtener un consorcio resistente compuesto incluso por especies no resistentes originalmente. Por el contrario, los microorganismos tolerantes que sólo pueden mantenerse viables frente al estrés y que no son capaces de adquirir elementos genéticos móviles, son diluidos en la sucesión de repiques hasta perderse.

En las experiencias de adaptación realizadas, en general se observaron velocidades de crecimiento máximo (μ) de los consorcios resistentes algo menores a las de los consorcios no expuestos, pero dentro del mismo orden de magnitud –quizás, en parte, porque se estableció un tiempo final fijo–. Esta observación sugiere que las especies originales probablemente no fueron reemplazadas por otras con velocidades de crecimiento menores; en ese caso, el cambio de velocidad puede explicarse por un cambio en la composición de los consorcios a medida que se seleccionaban los microorganismos resistentes y también por una inhibición parcial (con una inversión de una fracción de energía obtenida en el despliegue de los mecanismos de resistencia) de los microorganismos en presencia del contaminante. Este segundo punto puede asociarse a la extensión de la fase *lag* que se observó en el desarrollo de los

consorcios expuestos a metales; esta fase inicial de la curva de crecimiento se describe como el tiempo que requieren los microorganismos para generar las proteínas necesarias para sobrevivir, adaptarse al medio y duplicarse y, en general, medios más *hostiles* se correlacionan con fases de latencia más extendidas (Hamill *et al.*, 2020).

La selección de una especie de microorganismos resistentes en desmedro de las especies dominantes en el consorcio original se observó específicamente en los consorcios litótrofos acidófilos de SA; en ellos se observó un detrimento de la actividad hierro-oxidante al aumentar la concentración del catión metálico sin detectarse disminución en el recuento celular. Esto sugirió la selección de microorganismos acidófilos heterótrofos, no oxidantes de hierro, que obtenían electrones probablemente a partir del extracto de levadura. Este reemplazo pudo deberse también a una inhibición creciente de los microorganismos hierro-oxidantes asociada a un aumento del metabolismo heterotrófico. Este metabolismo puede generar ácidos orgánicos como producto de oxidaciones incompletas de fuentes orgánicas complejas. El aumento de la concentración de estos ácidos puede ser inhibitoria de microorganismos acidófilos ya que, en condiciones de bajo pH, los ácidos orgánicos se encuentran en su forma protonada y pueden difundir con facilidad a través de la membrana y hacia el interior de la célula. Una vez allí, el pH neutro favorece la disociación con la consecuente liberación de protones y disminución del pH intracelular, provocando la inhibición por reducción del gradiente de protones y, consecuentemente, de la síntesis de ATP (Sánchez-Andrea *et al.*, 2014).

Los valores de tolerancia y resistencia obtenidos fueron comparados con valores de CIM reportados en bibliografía. Los niveles de tolerancia mostrados ante una exposición repentina se encontraron en el orden de los valores reportados, pero, en la mayoría de los casos, por debajo de la mediana de la base de datos. Sin embargo, tras la adaptación, estos niveles aumentaron hasta concentraciones superiores a la de la mayoría de los microorganismos y consorcios resistentes reportados en literatura. La base de datos utilizada precisa valores de inhibición, es decir, las concentraciones para las cuales no se observó

crecimiento; no obstante, para ser utilizados en tecnologías ambientales (o en cualquier otro proceso), los microorganismos deben poder desarrollarse adecuadamente, es por eso que en este trabajo se buscaron las máximas concentraciones para las cuales los microorganismos son todavía funcionales (tolerancias). De este modo, las concentraciones de este trabajo están *subestimadas* en la comparación con las de la base de datos (la concentración inhibitoria mínima de los consorcios de este trabajo debe ser indefectiblemente mayor a la tolerancia máxima registrada).

El efecto del crecimiento microbiano en la concentración de los metales en solución ofrece indicios de los procesos que permiten la tolerancia a altas concentraciones y también de los potenciales mecanismos de resistencia que operan en los distintos consorcios.

Los consorcios anaeróbicos sulfato-reductores muestran una disminución notable de las concentraciones de los metales en solución que se debe a la reacción con metabolitos generados en el desarrollo de esos microorganismos (ver **ecuaciones 2.22 y 2.27** en la **sección 2.3.5**) y que dan origen a fases sólidas. Las fases sólidas obtenidas en estos consorcios se correspondían con los colores de los sulfuros de los metales presentes. En los consorcios SAnCo y SAnNi, el análisis por EDX mostró que los precipitados respondían a una relación metal azufre 1:1 coincidente con un sulfuro estequiométrico de tipo MS (donde M es el metal). De este modo, la ecuación que justifica lo observado es:



Los sólidos obtenidos a partir de los cultivos de los consorcios SAnCu y SAnCd mostraron relaciones azufre metal más complejas. Se ha reportado que es posible que durante la precipitación de sulfuros de cobre(II) ocurra parcialmente la reducción de Cu(II) a Cu(I), permitiendo la aparición de mezclas de diversos precipitados (Cu₂S, CuS y otros polisulfuros) así como la presencia en solución de diversos complejos solubles del tipo CuS(HS)_{n-n} (donde n es 2 o 3) (Lewis, 2010). La presencia de sulfuros de cobre(I) permitirían un incremento de la relación metal azufre, pero todavía menor a la indicada en el diagrama EDX, por

lo que es probable (aunque no pudo ser confirmada) que también haya ocurrido la precipitación de fosfatos y/u oxo-hidroxos del metal, especialmente considerando que durante el crecimiento de los microorganismos sulfato-reductores existe un incremento del pH del medio. Un proceso similar permitiría justificar la relación observada para el precipitado proveniente del cultivo del consorcio SAnCd.

Este fenómeno observado en los consorcios sulfato-reductores constituye uno de los mecanismos de resistencia a metales pesados que reducen su concentración. Esto sucede a través de la acción de distintos metabolitos que pueden formar compuestos insolubles (como en este caso) pero también complejos estables o incluso compuestos organometálicos.

En algunos consorcios organotróficos se observó una disminución de la concentración del ion metálico durante el crecimiento microbiano y, simultáneamente, se observó un cambio de viscosidad del cultivo y cierto brillo alrededor de las células. Estas observaciones sugieren la producción de material polimérico que puede formarse sobre la superficie de las células y/o liberarse al medio pudiendo adsorber parcialmente a los metales en solución. La adsorción y complejación sobre estos biopolímeros constituye otra barrera para evitar la entrada de los metales pesados a la célula y podrían ser los mecanismos propios de algunos de los consorcios organotróficos obtenidos.

En los casos en los que los microorganismos no son capaces de generar metabolitos que disminuyan la concentración metálica y, además, tampoco logran detener los metales pesados sobre la superficie celular, los cationes metálicos pueden ingresar a la célula a través de diferentes canales los cuales pueden ser específicos; específicos, pero para otros iones esenciales de similar carga, radio o relación carga/radio; o no específicos. Cuando esto ocurre, algunos microorganismos resistentes presentan mecanismos de secuestro intracelular, el cual implica la acumulación de los cationes en determinadas regiones del citoplasma celular. Las metalotioneínas y otras proteínas ricas en cisteína, en las cuales el grupo tiol (-SH) de la cisteína se une directamente a los cationes

metálicos, son acumuladores de metales pesados presentes en todos los dominios de la vida, principalmente en eucariotas. Sin embargo, son escasos los reportes sobre metalotioneínas en procariotas limitados únicamente a cianobacterias y pseudomonas. Homólogos de estas proteínas han sido identificados en algunas alfa-Proteobacterias, gamma-Proteobacterias y Firmicutes; y, hasta el momento, no se ha encontrado ninguna proteína semejante en el dominio Arquea (Nanda *et al.*, 2019; Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). Blindauer (2011) propone dos conclusiones respecto a estas observaciones: (1) las metalotioneínas y proteínas similares son, efectivamente, poco frecuentes y no están ampliamente distribuidas entre procariotas como sí en los otros dominios; o (2) dada su corta longitud y baja complejidad, sus secuencias son tan diferentes entre sí que resulta muy dificultosa la identificación a partir de las técnicas proteómicas y bioinformáticas disponibles en la actualidad.

Las concentraciones toleradas por los consorcios acidófilos fueron excepcionalmente elevadas superando los 20 g/L de metal en solución. Estos resultados están en sintonía con resultados previos que indican que los microorganismos acidófilos son, en general, mucho más resistentes que aquellos que se desarrollan a mayores valores de pH (Dopson *et al.*, 2003). Una de las explicaciones propuestas para esta elevada resistencia es que el elevado potencial positivo en el lado interno de la membrana, generado por el alto contenido de protones del lado exterior, conforma una suerte de *barrera iónica* que impediría el acceso de cationes como los metálicos (Dopson *et al.*, 2014). Estos autores se basan en esta propuesta para sugerir que la mayoría de los procariotas acidófilos son *tolerantes* más que *resistentes*, ya que se trata de un mecanismo general y no específico. No obstante, este mecanismo de tolerancia o resistencia, no se corresponde con nuestros resultados. Si la barrera iónica hubiera sido el mecanismo principal, los consorcios acidófilos deberían haberse mostrado más tolerantes que los otros consorcios incluso en la primera exposición; este efecto no fue observado para los consorcios SA y es apenas apreciable para los consorcios AL. Durante el proceso de adaptación, se produjo un incremento significativo de la tolerancia para los consorcios acidófilos comparada con el

aumento para los otros consorcios; esto indicaría que se activaron mecanismos genéticos específicos que incrementaron la resistencia de este tipo de microorganismos, más allá de la *barrera iónica* generada por la concentración de protones.

Dentro de los principales mecanismos específicos de resistencia a cationes metálicos (Silver & Phung, 1996; Bruins *et al.*, 2000), probablemente solo la exclusión permitiría justificar la alta resistencia observada en estos consorcios acidófilos sin que se haya modificado la concentración metálica soluble de modo significativo. La exclusión puede ocurrir por cambios en la permeabilidad de membrana causados por modificaciones en la pared, la membrana o la envoltura celular. La alteración en la producción de porinas o la generación de sitios de adhesión inespecíficos para iones pueden reducir la permeabilidad de la barrera, pero sólo confiere una resistencia limitada. Más extendido y diversificado entre procariotas está el mecanismo de exclusión a través de bombas de eflujo.

Nies (2003) describe tres sistemas de expulsión: transportadores CBA, facilitadores de difusión y ATPasas tipo-P. Los transportadores CBA están formados por una proteína de tipo RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*) que presenta un sitio de adhesión para el catión metálico, una proteína de la familia MFP (*Membrane Fusion Protein*) que se ancla a la membrana celular y un factor de membrana externa, OMF (*Outer Membrane Factor*), que forma un canal para la exclusión del catión. Este tipo de transportadores utiliza el gradiente de protones como fuente motriz ingresando protones del periplasma al citoplasma. El sistema de exclusión por difusión facilitada involucra proteínas transmembrana de la familia CDF (*Cation Difussion Facilitator*) que pueden utilizar distintos gradientes de concentración (de protones, de sodio o del mismo catión) como fuerza motriz. Por último, las ATPasas de tipo-P son transportadores con capacidad de hidrolizar ATP para cumplir su función. Estas enzimas transmembrana tienen un sitio de adhesión para ATP hacia el citoplasma y uno específico para el catión metálico que puede ser ingresado o excluido desde o hacia el periplasma.

Orell *et al.* (2012) proponen otro mecanismo relacionado a extremófilos acidófilos a través de polímeros de polifosfato (PolyP) los cuales –sugieren– pueden cumplir un rol preponderante en la adaptación frente a factores ambientales extremos. Los PolyP son polímeros lineales de residuos de ortofosfato (Pi) acumulados en el citoplasma que tienen un rol relevante como reservorios de fósforo y energía. Se ha comprobado que microorganismos acidófilos extremófilos (como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por ejemplo) presentan una mayor acumulación de PolyP, en relación con los microorganismos neutrófilos como *E. Coli*. Los mutantes sin capacidad de producirlos tienen sensiblemente afectada su adaptabilidad y resistencia a cobre. Orell *et al.* (2012) demostraron, además, que existe una correlación directa entre la cantidad de PolyP acumulado y la concentración inhibitoria mínima frente a este metal. Estos autores propusieron que los PolyP intervienen en la neutralización de los protones ingresados al interior celular durante la exclusión por transportadores tipo CBA y por la actividad de transportadores de protones acoplados a ATPasas a partir de la capacidad buffer del anión fosfato. De esta manera, sugieren que el metabolismo de PolyP impide la acidificación del citoplasma y permite, a su vez, un rendimiento mayor de los sistemas de resistencia optimizando la homeostasis de los microorganismos acidófilos extremófilos. Este mecanismo propuesto podría explicar las resistencias de los consorcios litótrofos acidófilos (significativamente superiores a otros consorcios) que se observaron en este trabajo, siendo posible que los sucesivos repiques hayan optimizado la generación y la regulación del metabolismo de PolyP favoreciendo la adaptabilidad de estos microorganismos

En el siguiente capítulo se ahondará en el estudio de los posibles mecanismos de resistencia de los consorcios desde el punto de vista genético, analizando la presencia de diferentes genes específicos.

2.5. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha reportado la obtención de numerosos consorcios microbianos con distintos metabolismos de interés y capaces de tolerar altas concentraciones de cinco metales pesados. Aunque en sus sitios de origen no se detectaron concentraciones significativas de estos metales, estos consorcios alcanzaron elevadas tolerancias por adaptación sucesiva, indicando una alta capacidad de adaptación y/o, quizás, a la presencia de mecanismos de resistencia adquiridos en períodos previos en los que debieron convivir con altas concentraciones de estos metales.

Las tolerancias demostradas por estos consorcios fueron mayores a las concentraciones inhibitorias mínimas de la mayoría de los microorganismos resistentes reportados en bibliografía. A pesar de que no se detectó una diferencia entre las tolerancias exhibidas por los distintos metabolismos ante una exposición abrupta, los microorganismos litótrofos acidófilos lograron adaptarse a concentraciones significativamente más elevadas de metales que los otros dos metabolismos, revelando una mayor adaptabilidad por parte de este tipo de microorganismos. En algunos de estos consorcios se detectó la pérdida de algunas funcionalidades (en particular, la actividad hierro-oxidante) durante el período de adaptación, aunque eso no significó una afectación en la velocidad de crecimiento, lo que sugiere la selección de microorganismos resistentes con otras capacidades metabólicas.

El desarrollo microbiano de los consorcios anaeróbicos produjo una disminución notable de la concentración metálica mostrando que la inmovilización por vía de la formación de compuestos insolubles es el principal mecanismo que fundamenta su tolerancia. En algunos consorcios organotróficos, el efecto del crecimiento sobre la concentración metálica fue significativo pero leve mostrando un posible mecanismo de adsorción por material polimérico. Finalmente, para el resto de los consorcios no se observó un efecto relevante en la concentración metálica sugiriendo que el mecanismo más probable sería el de exclusión por bombas de eflujo.

En el capítulo siguiente, se estudiará el efecto que la exposición a los metales tuvo sobre el perfil filogenético de la comunidad y los consorcios resistentes obtenidos y se analizarán los mecanismos de resistencia desde el punto de vista genético. Finalmente, en el último capítulo se aplicarán algunos de estos consorcios en procesos de remediación y recuperación de cationes metálicos.



CAPÍTULO III

Análisis molecular de los consorcios microbianos



3.1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados ejercen una significativa presión de selección sobre las comunidades microbianas y su presencia en ambientes intensamente expuestos es capaz de moldear comunidades hiper-especializadas. Usualmente, este proceso involucra la pérdida de diversidad y de capacidades funcionales en ese ecosistema, disminuyendo su resiliencia y posibilidad de restauración. A su vez, ocasionalmente, se ha observado que el proceso de selección por estrés metálico es acompañado de mecanismos de co-resistencia a compuestos que no están presentes en ese ambiente; este mecanismo se fundamenta en la transferencia horizontal de genes de resistencia ubicados en plásmidos, lo que fomenta la formación de comunidades poli-resistentes. Este fenómeno se da, especialmente, cuando las presiones de selección varían en el tiempo, como ocurre en ciertos ambientes extremos expuestos a cambios naturales (por actividad volcánica, por ejemplo).

El análisis de la variación del perfil de una comunidad microbiana en respuesta a la presencia de metales es especialmente interesante para la elaboración de procesos de monitoreo y prevención de ambientes en riesgo o bajo tratamiento. A su vez, la identificación de indicadores biológicos que pudieran alertar tempranamente sobre la presencia de contaminantes en estos ambientes se constituye como una fuerte herramienta de diagnóstico ecológico. El uso de microorganismos con esa función ofrece la ventaja conferida por su rápida respuesta a los cambios ambientales, basada en la elevada velocidad de reproducción; además, el muestreo necesario para su estudio es sencillo y de bajo impacto sobre el ambiente. En ese sentido, **la respuesta de los distintos microorganismos presentes en la comunidad ante la presencia de contaminantes permite identificar especies microbianas con potencial de indicador biológico.**

Recientemente, la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S ARNr se ha vuelto el método predilecto para estudiar comunidades y consorcios microbianos en distintas condiciones. Esta técnica permite conocer las secuencias presentes en una muestra determinada y, a partir de ellas, inferir los microorganismos que componen esa comunidad. La *ecología numérica*, desarrollada por Legendre y Legendre a partir de 1970, permitió aplicar un conjunto de herramientas de estadística multivariada para analizar y evaluar hipótesis a partir de la enorme cantidad de datos que surgen de la secuenciación masiva. Desde entonces, la ecología microbiana ha crecido exponencialmente y se han abierto las puertas para nuevos análisis y nuevas metodologías que permiten responder (y hacer) nuevas preguntas.

En este capítulo se utilizaron técnicas moleculares con el fin de estudiar el efecto que tuvo la exposición a metales en el perfil taxonómico de los consorcios; simultáneamente, se indagó la ocurrencia y prevalencia de diferentes taxones en función de las condiciones de cultivo. Además, se analizó la presencia de genes específicos de resistencia a metales con el objetivo de determinar los mecanismos presentes en cada consorcio y, de esta manera, vislumbrar su potencial tecnológico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Extracción de material genético

Se realizaron extracciones de ADN genómico de las muestras ambientales (comunidades) y de los cultivos (consorcios). En estos últimos, se utilizó el protocolo de CTAB (Andreou, 2013); para ello, previo a la extracción, 10 mL de cultivo fueron lavados dos o tres veces hasta alcanzar una pálida coloración del sobrenadante. En los cultivos acidófilos el lavado se realizó con agua ácida (pH 1,5) mientras que en los cultivos neutrófilos se utilizó PBS. Los pellets lavados fueron resuspendidos en 250-750 μ L de buffer TE (dependiendo de la cantidad de pellet obtenido) para iniciar la extracción según el protocolo citado. De acuerdo a ello y en una descripción breve, la muestra resuspendida en buffer TE fue homogeneizada con perlas de vidrio durante tres ciclos de 15 segundos a 5000 RPM en un equipo Precellys 24 (Bertin Techonologys, Francia). Posteriormente, las perlas fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante fue tratado inicialmente con enzima lisozima y luego con proteinasa K (cada tratamiento enzimático fue realizado a 37°C durante 1 h). Al finalizar estos tratamientos, se adicionó CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) en NaCl; en estas condiciones de alta carga iónica, el CTAB compleja y precipita proteínas y polisacáridos permitiendo su separación por centrifugación. Luego, se realizó una nueva separación de fases con fenol-cloroformo para descartar otros compuestos orgánicos y anfipáticos (como las proteínas) y retener la fase acuosa con el material genético. Finalmente, el material genético fue precipitado con alcohol isopropílico, concentrado por centrifugación, lavado con etanol y resuspendido en un volumen deseado de buffer Tris (10 mM, pH 8). El material genético obtenido de esta manera fue conservado a -20°C.

Para la extracción de material genómico de la muestra ambiental de Salto del Agrio, que consistía mayormente en agua, se filtraron 500 mL a través de una membrana de 0,22 μ m de tamaño de poro que luego fue lavada con 1 mL de PBS. En el caso de la muestra de Agua de Limón, que era principalmente lodo, se

utilizaron directamente 0,5 g de muestra. Tanto las membranas, en el primer caso, como el lodo, en el segundo, fueron resuspendidos en 750 μ L de buffer de lisis (Tris pH 8 (10 mM), EDTA pH 8 (100 mM) y SDS (0.5%)), tratados con 0,5 g de perlas de vidrio y homogeneizados en tres ciclos de 15 segundos a 5000 RPM en un equipo Precellys 24 (Bertin Technologies, Francia). Luego se prosiguió según el protocolo de CTAB (Andreou, 2013) del mismo modo que con los cultivos.

La pureza y la concentración del material genético extraído fueron medidas utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EEUU). El material genético extraído fue considerado aceptable si mostraba un pico en el espectro de absorción a la longitud de onda de 260 nm y relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 mayores o iguales a 1,8.

3.2.2. Evaluación de presencia de genes de resistencia a metales

Previamente a la evaluación de la presencia de genes de resistencia, se realizaron PCR utilizando *primers* específicos para el gen 16S ARNr para comprobar la ausencia de inhibidores de la amplificación en el material genético extraído. Los *primers* utilizados fueron 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) y la amplificación se realizó utilizando la enzima polimerasa GoTaq (ProMega, EEUU) en un termociclador Eppendorf Mastercycler EP 384 (Eppendorf, Alemania). El ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 90 s, con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Posteriormente, se evaluó la presencia de genes de resistencia a metales pesados en los consorcios resistentes y en los no expuestos. Los genes seleccionados y sus respectivos *primers* fueron recopilados de la literatura (ver **Tabla 3.1** y **3.2**) y de la base de datos BacMet (Pal *et al.*, 2014).

Tabla 3.1 – Genes seleccionados y secuencia de los primers específicos utilizados

Gen	Primer F	Primer R
<i>cadA</i>	CAGAGCACTTTACTGACCATCAATCGTT	CTTCTTCATTTAACGTTCCAGCAAAAA
<i>cusA</i>	ATGCSACVGGYGTTGGCTGG	CCRTTCAGYTCGGCRATRCC
<i>copA</i>	GGTGCTGATCATCGCCTG	GGGCGTCGTTGATACCGT
<i>pcoA</i>	GCTGCAGATGGCCAGTATGTAAA	CCCTCGAGCGTAACCGGTCC
<i>zntA</i>	AGTACGTAACGATGACGTGCTTG	GTCACCGCTTTGACTTTATCTTCC
<i>zitB</i>	AATTACTTGAAGGTGCACCGGTAT	ATCCATCAGGTAGTGTGGATCTG
<i>czcA</i>	TCGACGGBGCCGTGGTSMTBGTCGAGAA	GTVAWSGCCAKCGGVBBGGAACA
<i>cnr</i>	GTCTTCGCTGGAAAGAGCAG	CCGGCATTGTCACTGCCAC
<i>nccA</i>	ACGCCGGACATCACGAACAAG	CCAGCGCACCGAGACTCATCA

Tabla 3.2 – Genes de resistencia y parámetros de amplificación

Gen	Resistencia	(pb)	T _{an} (°C)	t _{elong} (s)	Referencia
<i>cadA</i>	Cd	566	52	120	Mullapudi <i>et al.</i> (2010)
<i>cusA</i>	Cu	410	61	45	Besaury <i>et al.</i> (2013)
<i>copA</i>	Cu	765	57	120	Besaury <i>et al.</i> (2013)
<i>pcoA</i>	Cu	147	60	45	Xiong <i>et al.</i> (2015)
<i>zntA</i>	Zn	200	62	45	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>zitB</i>	Zn	200	60	45	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>czcA</i>	Co, Zn, Cd	232	63	45	Roosa <i>et al.</i> (2014)
<i>cnr</i>	Ni, Co	400	55	60	Fosso-Kankeu <i>et al.</i> (2016)
<i>nccA</i>	Ni, Co, Cd	1141	54	120	Fierros-Romero <i>et al.</i> (2016)

En todos los casos, la mezcla de reacción consistió de *primer F* (0,5 µM), *primer R* (0,5 µM), dNTPs (0,25 µM), Taq polimerasa (1 U), MgCl₂ (1,5 mM) en 25 µL finales de buffer de reacción (proveído por la empresa productora de la enzima polimerasa utilizada) con 3 µL de molde con ~10-100 ng ADN/µL. En este trabajo se utilizaron enzimas polimerasas GoTaq (ProMega, EEUU) y Pegasus (Pb-1, Buenos Aires, Argentina).

Los programas de termociclado fueron adaptados según la temperatura de *annealing* y el tiempo de elongación apropiados para el par de *primers* utilizados (**Tabla 3.2**), mientras que la temperatura de desnaturalización inicial se ajustó a las recomendaciones del proveedor de la enzima polimerasa usada en cada caso (95°C para GoTaq y 94°C para Pegasus).

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa 1,2% para amplicones de 150-800 pb de longitud y 0,8% para amplicones mayores a 800 pb, en presencia de blancos de reacción y patrones de peso molecular (Pb-I, Buenos Aires, Argentina). Cada electroforesis se llevó a cabo durante 40-60 minutos a 90 V.

Debido a que no se dispuso de material genético que pudiera valer de control positivo, en el caso de no observar banda en ninguna de las calles, se repitió la reacción dos veces subiendo la temperatura de *annealing* citada en la tabla 1°C en cada repetición para disminuir la especificidad.

3.2.3. Secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr

Se realizaron secuenciaciones de los amplicones del gen 16S ARNr de los consorcios y las comunidades usando *metabarcodes* (proceso llamado *metabarcoding sequencing* o *amplicon sequencing*, y a veces también, pero erróneamente, metagenómica de 16S ARNr). Las secuenciaciones se realizaron como *paired-end reads* de 300 pb utilizando la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq (Illumina, EEUU). El material genético de los consorcios fue secuenciado en MR DNA (Molecular Research, EEUU) amplificando la región hipervariable V4-V5 usando los *primers* 515F (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) y 909R (CCCGYCAATTCMTTTRAGT). La secuenciación de la comunidad de SA se realizó bajo el mismo servicio, pero utilizando los *primers* 341F (CCTACGGGNBGCASCAG) y 806R (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) que corresponden a las regiones V3-V4. El material genético de la comunidad de AL, en cambio, fue secuenciado en el High Impact Research Institute (University of Malaysia, Malasia) utilizando los mismos *primers* que para la comunidad de SA (341F y 806R). Las secuenciaciones de las muestras ambientales fueron diferentes entre sí y diferentes a las de los consorcios debido a que formaron parte de trabajos en colaboración con grupos de investigación independientes (Lopez Bedogni *et al.* (2020) y Massello *et al.* (2020)).

Los datos de las secuenciaciones fueron depositados en la base de datos de NCBI Bioprojects⁶ con el código de acceso PRJNA542136.

3.2.4. Procesamiento de los datos de secuenciación

Los datos de secuenciación fueron procesados siguiendo tres metodologías diferentes: filotipos, *operational taxonomic units* (OTUs) y *amplicon sequence variants* (ASVs).

El análisis de filotipos consiste en asignar una taxonomía a cada secuencia de una muestra de acuerdo con su similitud con una base de datos de secuencias clasificadas. Luego, las secuencias de la muestra con igual taxonomía son agrupadas y su abundancia sumada a un nivel definido (filo, clase, familia, etc.). De esta manera, se puede analizar, por ejemplo, la abundancia de un género determinado en diferentes muestras aun cuando estas muestras fueran secuenciadas de manera diferente, e incluso, bajo tecnologías diferentes. No obstante, el análisis de filotipos está fuertemente limitado y determinado por la profundidad y la calidad de la base de datos utilizada para clasificar taxonómicamente las secuencias. Además, debido a que la longitud de los amplicones usualmente secuenciados por *metabarcoding* rara vez permite distinguir entre especies de un mismo género, el análisis de filotipos omite las pequeñas diferencias que pueden existir entre algunas secuencias perdiendo sensibilidad. Debe observarse que el análisis de filotipos no compara las secuencias de la muestra entre sí, sino a través de la base de datos.

El análisis de OTUs ha sido el más utilizado históricamente. La metodología, descrita brevemente, consiste en alinear todas las secuencias de un conjunto de muestras (*dataset*) y agruparlas de acuerdo con la similitud entre sí fijando un porcentaje de identidad como corte (usualmente entre 97% y 99%). El proceso de alineamiento y de agrupado (llamado *clustering*) es computacionalmente muy demandante y se incrementa exponencialmente con el

⁶ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>

número de secuencias presentes en el análisis; por esta razón, suele ser el paso clave y limitante, siendo muchas veces necesario preagrupar muestras que tienen 1 o 2 bases de diferencia para poder procesarlas, a costo de una pérdida en la sensibilidad del procedimiento. Luego, para cada grupo (*clúster*) de secuencias se determina la secuencia consenso y, entonces, ese *clúster* pasa a ser un OTU. Finalmente, cada OTU, a partir de su secuencia consenso, puede ser clasificado taxonómicamente utilizando una base de datos con un valor de corte de identidad definido. Es requisito para este análisis que las secuencias del *dataset* procesadas sean alineables (porque así se construyen los OTUs); esto significa, en el caso de la secuenciación de amplicones de 16S ARNr, que deben corresponder a la misma región hipervariable del gen. Dado que cada OTU es un *clúster* formado por las secuencias que se agruparon en un análisis particular, el análisis es cerrado y sólo puede compararse aquello que fue procesado en conjunto, es decir, el *dataset* (los OTUs de un análisis no son extrapolables a otro análisis de OTUs).

Callahan *et al.* (2016) desarrollaron el método de variaciones de secuencia de amplicón (ASVs) como alternativa al método de análisis de OTUs. En este procesamiento cada muestra se analiza por separado (aunque pertenezcan a un mismo *dataset*). Las secuencias son alineadas utilizando como molde la secuencia más abundante y luego se calcula la tasa de error de ese alineamiento utilizando el *quality score* de los nucleótidos en cada posición y la probabilidad de transición de nucleótido a nucleótido. A partir de esto, se calcula la probabilidad (p) de que la secuencia molde (q) se convierta por error en otra secuencia considerando que este proceso responde a una distribución de Poisson y contemplando las abundancias de cada una. Un valor p pequeño para la secuencia x , significa que es muy poco probable que se hubiera obtenido por error a partir de la secuencia molde q ; es decir, la secuencia x es diferente a la secuencia q y es entonces una nueva variante (otro ASV). En ese punto, la secuencia x pasa a ser molde para un nuevo alineamiento en que se repiten los pasos. El valor p de corte para definir una secuencia como diferente está sugerido por los autores en 1×10^{-40} . El procedimiento itera hasta que todos los valores p obtenidos en todos los

alineamientos son mayores al valor de corte, lo que significa que las secuencias en esos alineamientos son idénticas o tienen diferencias que no pueden distinguirse de la tasa de error de la secuenciación. Dado que la tasa de error es propia de la muestra y cada secuencia de ASV es *verdadera* (no es una secuencia consenso), los datos obtenidos para una muestra son extrapolables para comparar con otras muestras procesadas de manera independiente y podrían agregarse si los ASVs de las muestras son alineables (corresponden a la misma región del gen). Luego de obtener los ASVs, éstos pueden clasificarse taxonómicamente utilizando una base de datos; como la secuencia del ASV se considera *verdadera*, la asignación taxonómica se realiza con una identidad del 100%.

Debido a que los datos de este trabajo provenían de distintos procesos de secuenciación y apuntaban a distintas regiones del gen 16S ARNr y, por lo tanto, no era posible realizar un alineamiento entre las secuencias de los consorcios y las muestras ambientales, la comparación de las comunidades con los consorcios se hizo a través del análisis de filotipos. La comparación de los consorcios entre sí, en cambio, fue realizado usando el análisis de OTUs y el análisis por ASVs.

Para el análisis de OTUs, las secuencias crudas de los consorcios (2 971 808 secuencias) fueron procesadas utilizando el *software* MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009) siguiendo el procedimiento estándar propuesto por Kozich *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Los *contigs* de las lecturas fueron ensamblados y luego filtrados de acuerdo con los siguientes parámetros de calidad: *quality-score* mayor a 25, longitud menor a 379 pb (la distancia entre el último nucleótido del *primer* 515F y el primer nucleótido del *primer* 909R en la secuencia de referencia es de 373 pb), ausencia de bases ambiguas y un máximo de 8 homopolímeros. Se utilizó el algoritmo VSEARCH para detectar y remover las quimeras. Para agilizar el procesamiento posterior y disminuir la sobreestimación, las secuencias seleccionadas fueron sometidas a un proceso de *pre-cluster* permitiendo hasta 2 diferencias. Luego, se clasificaron taxonómicamente utilizando la base de datos

no redundante de Silva (v132)⁷ con un 97% de identidad como corte; las secuencias clasificadas como mitocondria y cloroplastos y aquellas de linajes desconocidos fueron removidas. Al final de este procesamiento, se obtuvieron 60 751 secuencias únicas y se realizó la construcción de los OTUs al 97% de identidad. De esta manera se obtuvieron 4217 OTUs.

El análisis de ASVs fue realizado utilizando el paquete DADA2 de R (Callahan *et al.*, 2016). Dado que este análisis se realiza sobre cada muestra por separado, el primer paso necesario es el *demultiplex* de los datos crudos (es decir, la creación de un archivo de secuenciación para cada muestra); para ello se utilizó la herramienta Fastx-toolkit⁸. Para el análisis por DADA2, se utilizaron los parámetros estándar y se siguieron los pasos propuestos por los autores (Callahan *et al.*, 2016)⁹. Las secuencias de los consorcios, así como la de la comunidad de SA, eran de buena calidad y, por lo tanto, sólo se eliminaron los primeros 10 nucleótidos de cada lectura. Los datos de secuenciación de la comunidad de AL eran de calidad regular, en particular, la lectura *reverse*, por lo que sólo se utilizaron los datos de la lectura *forward* eliminando los primeros 17 nucleótidos. Al finalizar el *pipeline* de DADA2 y tras eliminar las secuencias quiméricas, se obtuvieron entre 34 555 y 94 694 secuencias que representaron entre el 40% y el 60% de las secuencias ingresadas y cerca del 90% de las secuencias filtradas. Estos porcentajes son considerados buenos por Callahan *et al.* (2016).

La **Tabla 3.3** muestra la cantidad de secuencias crudas obtenidas durante la secuenciación y la cantidad de secuencias finales tras el procesamiento.

⁷ (2020) <https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>

⁸ Software disponible *online* (2021): http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit

⁹ Tutorial disponible *online* (2021): <https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial>

Tabla 3.3 – Cantidad de secuencias crudas iniciales y luego de su procesamiento

Muestra	Crudas	Finales
AL	242 246	116 319
ALaSM	144 714	88 217
ALaCd	86 371	48 415
ALaCo	79 432	42 849
ALaCu	133 860	94 694
ALaNi	99 925	58 750
ALaZn	64 611	34 555
ALoSM	96 718	60 811
ALoCd	73 246	41 142
ALoCo	97 719	59 541
ALoCu	75 581	42 868
ALoNi	93 037	50 917
ALoZn	97 939	57 814
SA	140 829	74 276
SAaSM	115 736	52 898
SAaCd	90 690	50 417
SAaCo	108 888	68 468
SAaCu	105 407	61 149
SAaNi	185 971	77 643
SAaZn	93 391	51 343
SAnSM	108 434	63 858
SAnCd	93 354	54 714
SAnCo	90 668	47 263
SAnCu	81 636	39 496
SAnNi	73 126	38 802
SAnZn	85 124	45 555
SAoSM	88 843	42 493
SAoCd	91 124	58 967
SAoCo	79 713	50 287
SAoCu	116 217	68 761
SAoNi	100 803	63 689
SAoZn	119 530	79 815
TOTAL	3 354 883	1 886 786

La asignación taxonómica se realizó utilizando el *training set* de la base de datos no redundante de Silva (v132), clasificando luego según identidad exacta al nivel de especie. Los ASVs que no pudieron ser asignados a ningún reino y aquellos asignados a Eukarya fueron removidos. Al finalizar este proceso, fueron obtenidos 749 ASVs de los datos de todos los consorcios, 614 de los de la comunidad de SA y 60 de los de la comunidad de AL.

Para el análisis de filotipos, las tablas de los ASVs clasificados taxonómicamente fueron fusionadas y agregadas al nivel de género. Luego de ese proceso, se obtuvieron 420 filotipos.

3.2.5. Análisis del perfil taxonómico de los consorcios

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R (R Core Team, 2021) utilizando el paquete que se especificará en cada ocasión, mientras que los gráficos fueron construidos usando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016). Los análisis se realizaron de forma independiente utilizando los datos procesados según las tres metodologías descriptas previamente (**sección 3.2.4**).

Inicialmente, se certificó la calidad del muestreo (es decir, la adecuada representación de cada muestra/consorcio) a través de curvas de rarefacción construidas utilizando el paquete vegan (Oksanen *et al.*, 2020). Luego, se calcularon los índices de diversidad alfa de Shannon-Wiener y de Simpson (Thukral, 2017) usando el paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). El primer índice es una función de la cantidad de especies diferentes presentes y de su abundancia, por lo que es apropiado para estimar la riqueza de una muestra. El índice de Simpson, en cambio, evalúa la probabilidad de que dos organismos tomados al azar pertenezcan a la misma especie; es decir, este índice es de dominancia y permite estimar la equidad en una muestra. Dado que el índice de Simpson disminuye al aumentar la diversidad, usualmente se reporta la inversa de su función (1/Simpson).

Las muestras fueron agrupadas según su origen, metabolismo y su exposición a metales para evaluar diferentes hipótesis respecto a la diversidad alfa. Antes de la comparación, se testeó la distribución normal y homocedasticidad de esa agrupación a través del test de Shapiro-Wilk y el test de Levene para definir la posibilidad de realizar un análisis paramétrico (Borcard *et al.*, 2011). Dado que los datos crudos tenían un comportamiento heterocedástico ($p\text{-val} < 0,05$ en la prueba de Levene), se los transformó con la función logaritmo natural; con ello se obtuvo una distribución normal cumpliendo la condición de homocedasticidad ($p\text{-val} > 0,1$). Siendo ambas suposiciones ciertas, se calculó la diferencia entre los índices de forma paramétrica a través de un análisis multivariante de la varianza (MANOVA); en los casos de diferencias significativas, se realizó una prueba t de Student o un análisis de la varianza (ANOVA) seguido por el test *post-hoc* de Tukey, según correspondiera.

El análisis y la comparación de los perfiles taxonómicos de las distintas muestras permite observar en forma global el efecto que puede tener una o más variables sobre los consorcios; en este caso, esas variables fueron el efecto del cultivo, del medio utilizado y de la presión metálica. Para este proceso, se calcularon los coeficientes de disimilitud (también llamados *distancia*) que evalúan las diferencias en la abundancia de los distintos taxones presentes y, de esta manera, cuantifican las diferencias que existen entre dos muestras en un único valor (el coeficiente de disimilitud o distancia). El coeficiente de disimilitud de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957; Borcard *et al.*, 2011) es uno de los más utilizados para este tipo de análisis y define la disimilitud (d) entre dos muestras j y k como:

$$d_{jk} = \frac{\sum |x_{ij} - x_{ik}|}{\sum (x_{ij} + x_{ik})} \quad (3.1)$$

donde x es la abundancia de la especie i .

Se calcularon los coeficientes de disimilitud de Bray-Curtis sobre las abundancias crudas de los taxones de cada muestra y se construyeron las

matrices de disimilitud. Las matrices fueron representadas luego en gráficos realizando escalados dimensionales no métricos (NMDS) calculados con 10 000 iteraciones usando la función metaMDS del paquete vegan. Luego, se evaluó un modelo que pudiera explicar el ordenamiento observado y determinar cuál o cuáles eran las variables que mayores cambios causaban en el perfil taxonómico. Para evaluar el modelo propuesto se utilizó la función betadisper (para calcular la dispersión de los miembros de un grupo determinado al centroide de dicho grupo) y la función adonis (para realizar un análisis de varianza multivariado a través de permutaciones (PERMANOVA)).

En el análisis de filotipos, se estudió el efecto del proceso de cultivo sobre los perfiles taxonómicos; las distancias entre los consorcios (cultivos) y sus respectivas comunidades (muestras ambientales) fueron evaluadas en función del metabolismo seleccionado.

En los análisis de OTUs y ASVs, se estudió el efecto de la exposición a metales en la composición microbiana; en ese caso, se evaluaron los coeficientes de Bray-Curtis en función de los consorcios tratados con metal y los no tratados.

Debido a que estos datos no cumplían con las suposiciones para un análisis paramétrico, se realizaron test de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon (Hollander *et al.*, 2015) para estudiar las distancias en función del origen de la muestra, el metabolismo seleccionado y/o el metal al que se expuso. Los p-valores obtenidos fueron ajustados de acuerdo con el método de Holm-Bonferroni para contrarrestar el riesgo de falsos positivos por realizar comparaciones múltiples. Estos test fueron realizados utilizando las funciones wilcoxtest y kruskal del paquete agricolae (de Mendiburu, 2017).

3.2.6. Inferencia metabólica

Se realizaron inferencias metabólicas a partir de las secuencias de los amplicones de 16S para cada muestra utilizando el método PAPRICA (predicción de rutas a través de ubicación filogenética) (Bowman & Ducklow, 2015) y siguiendo los pasos recomendados por los autores (Erazo *et al.*, 2021). PAPRICA utiliza un árbol filogenético de referencia de secuencias del gen 16S ARNr construido con todos los genomas completos disponibles en la base de datos GenBank (Sayers *et al.*, 2020). Las secuencias de las muestras *query* ingresadas al *pipeline* son ubicadas en ese árbol de referencia de acuerdo con su similitud; luego, a cada muestra se le asigna el *genoma consenso* construido a partir del genoma compartido por todos los clados originados desde donde se ubicó la muestra *query*. Por ejemplo, si el ASV 1 de una muestra *x* es ubicado en el árbol de referencia en el nodo *z* (a partir de la secuencia del gen 16S ARNr), y del nodo *z* surgen dos clados (especies *A* y *B* cuyos genomas completos están disponibles en GenBank), al ASV 1 de la muestra *x* se le asignan todos los genes compartidos por las especies *A* y *B*.

Las inferencias metabólicas fueron realizadas utilizando las abundancias obtenidas por el análisis de ASVs. Para la ubicación filogenética se utilizaron los árboles de referencia de los dominios de bacteria y de arquea; las tablas resultantes de estos análisis se agregaron y analizaron en conjunto para ambos dominios. Los datos fueron normalizados en función del número de secuencias presentes corregidas por el número estimado de copias del gen 16S ARNr. La estimación del número de copias del gen 16S ARNr es realizado por PAPRICA a partir de los genomas completos del GenBank. De este modo, si un ASV presentaba una abundancia de 20 pero, de acuerdo con su ubicación filogenética, se estima que posee en promedio dos copias del gen 16S ARNr, la abundancia de ese ASV es 10. Al corregir los datos de este modo, lo que se obtiene es el número estimado de microorganismos. En consecuencia, la abundancia de las rutas metabólicas predichas debe entenderse como la abundancia de cada ruta en un *microorganismo representativo* de la muestra, donde una abundancia de 1 significa que todos los microorganismos de esa muestra contienen dicha ruta.

Finalmente, se realizó un *clustering* jerárquico usando la función *hclust*; se calcularon las distancias euclidianas para cada ruta determinada y se construyeron los *clústeres* siguiendo el método de *complete-linkage*.

3.2.7. Análisis de correlaciones

Se analizaron posibles correlaciones de los índices de alfa diversidad calculados. Por un lado, se evaluó la hipótesis de la existencia de una correlación entre la diversidad y la resistencia a metales (determinadas en el **Capítulo 2**); por otro lado, se estudió la hipótesis de correlación entre la diversidad y las capacidades funcionales (la cantidad de rutas metabólicas inferidas presentes con abundancia mayor a 0). Ambos test fueron realizados usando la función *cor* para test no paramétricos de correlación de Spearman (Kloke & McKean, 2014).

3.2.8. Análisis de ocurrencia

Se analizó la abundancia y ocurrencia de los filotipos en las comunidades (las muestras ambientales) y en los consorcios. Posteriormente, se realizó el análisis con los ASVs priorizando aquellos taxones que tuvieran un comportamiento diferencial en los consorcios resistentes respecto a los no expuestos a metales.

Para un primer estudio se utilizaron los datos procesados por la metodología de ASVs clasificados taxonómicamente con la base de datos Silva (v132) (**sección 3.2.4**). Las abundancias fueron agregadas a cuatro niveles filogenéticos: dominio, filo, clase y género; se analizó la distribución de los filotipos en las comunidades autóctonas y en los distintos metabolismos de los consorcios. Luego, se analizó la ocurrencia de las secuencias (es decir de los ASVs, independientemente de su clasificación taxonómica) en los consorcios, determinando cuáles eran los ASVs predominantes en cada caso.

Por último, los consorcios fueron agrupados en función del metal al que fueron expuestos (independientemente del metabolismo seleccionado) y se buscó seleccionar los ASVs que tuvieran un comportamiento diferencial entre los consorcios expuestos y no expuestos. Estos ASVs podrían identificar a potenciales especies indicadoras de la presencia de metal. El análisis se realizó utilizando el paquete *indicspecies* (De Cáceres & Legendre, 2009); este paquete provee funciones que permiten evaluar el nivel de relación (y su significancia) entre la ocurrencia de especies y sitios agrupados por el/la usuaria/o, a la vez que identifica –de existir– especies/taxones indicadores de cada grupo de sitios. Para ello utiliza el índice llamado *Indicator value* (IndVal) (Dufrene & Legendre, 1997; De Cáceres *et al.*, 2010), que se define como producto de dos componentes denominados *A* y *B*. El componente *A*, llamado especificidad, estima la probabilidad de que un sitio *S* pertenezca a un grupo *Z* dado que en él se encuentra la especie *x*. El componente *B*, denominado fidelidad o sensibilidad, se define como la probabilidad de encontrar la especie *x* en un sitio *S* dado que este pertenece al grupo *Z*. Así, un valor de $A=1$ para la especie *x* en el grupo *Z* indica que la especie sólo está presente en sitios de ese grupo y no en los otros sitios. Por otro lado, un valor de $B=1$ para la especie *x* en el grupo *Z* indica que la especie está presente en todos los sitios del grupo *Z*. Debe considerarse que, si una especie *y* se encuentra únicamente en una muestra, tendrá un valor de $A=1$ para el grupo de esa muestra, pero un valor de $B=0$, ya que no se encuentra en ninguna otra muestra de ese grupo. Del mismo modo, una especie *k* que se encuentre en todos los sitios, independientemente del grupo, tendrá un valor de $B=1$ pero un valor de $A=0$ en todos los grupos ya que no es específico de ninguno de ellos.

Se calculó el IndVal para los consorcios agrupados según el origen y en función de si habían sido expuestos a metales o no, luego se analizó la ocurrencia de los ASVs con mayor índice, considerando sólo aquellos ASVs que sumaran abundancia mayor al 0,1% entre todas las muestras.

3.2.9. Biogeografía de ASVs seleccionados

Para cada muestra (AL y SA) se seleccionaron los ASVs que exhibieron comportamiento diferencial tras la exposición a metales, y que, de acuerdo con su *indicator value*, tuvieran potencial como indicadores de metales. Se seleccionaron también aquellos ASVs con abundancia en todos los consorcios, sugiriendo que fueron indiferentes a la exposición a metales y a la naturaleza del metal (*secuencias neutrales*).

Se utilizó el paquete BLAST+ de NCBI (Camacho *et al.*, 2009) para buscar otros reportes en el mundo de secuencias similares a los ASVs seleccionados con el objetivo de analizar su ocurrencia a nivel global. La búsqueda se realizó utilizando el programa blastn con el algoritmo megablast sobre la base de datos de nucleótidos (nt) filtrada para secuencias de longitud entre 1000 y 2000 pb (para favorecer la selección de secuencias de buena calidad de microorganismos aislados) y obteniendo solo los *hits* con identidad del 100% y con cobertura sobre toda la longitud del ASV *query*; es decir, no se permitieron *mismatches* ni *gaps*.

De cada *hit*, a partir de su número de acceso (*accession number*), se extrajo la información presente en el GenBank (la cual es proporcionada por la persona que carga la secuencia a la base de datos); en particular, se importó la taxonomía asignada (*organism*), la ubicación geográfica del aislamiento (*country*) y las coordenadas (*lat_long*), el tipo de fuente de donde fue aislado (*isolation_source*), y, de existir, la publicación en que fue descrito (*pub*). Luego, de acuerdo con lo reportado como *isolation_source* y a lo mencionado en la publicación, las fuentes de aislamiento fueron clasificadas en diez categorías:

- ◆ Acuático: incluye ambientes marinos, lacustres y fluviales, y también subambientes como manglares, estuarios y pantanos;
- ◆ Suelo: incluye principalmente a suelos de bosques y montañas, y, en general, ambientes terrestres con poca intervención humana;
- ◆ Geotermal: incluye *hotsprings*, fumarolas y regiones volcánicas;
- ◆ Minero: incluye aislamientos provenientes de diques de cola, drenajes ácidos y minerales explotados;

- ◆ Agrícola: se refiere a suelos con actividad de cultivo e incluye aislamientos de ambientes rizosféricos;
- ◆ Impactado: se refiere a ambientes impactados con presencia de compuestos tóxicos por actividad humana directa o indirecta, incluyendo efluentes industriales, suelos contaminados con hidrocarburos y aguas residuales;
- ◆ Endófito: incluye a los aislamientos de microorganismos endófitos de plantas y hongos aislados de raíces, tallos, hojas, frutos, etc.;
- ◆ Microbioma: se refiere a microorganismos que forman/formarían parte del microbioma de animales e insectos, aislamientos de intestino, heces, piel, exoesqueleto, etc.;
- ◆ Bioproceso: incluye aislamientos que se obtuvieron de biorreactores, por ejemplo, barros activados, pilas y columnas de biolixiviación;
- ◆ Otros: referido a ambientes y fuentes que no entran en ninguna de las categorías anteriores; incluye aislamientos desde superficie de equipos, laboratorios, maquinaria, aislamientos de microorganismos de la atmósfera y vapores, reportes de control de calidad de alimentos, compuestos químicos, etc.

Se analizó la categoría de la fuente de aislamiento de los *hits* de los ASVs seleccionados, comparando lo obtenido para los ASVs con comportamiento diferencial respecto al metal y los ASVs presentes en todos los cultivos. Para ello se realizó un diagrama de cuerdas con el paquete *circlize* (Gu *et al.*, 2014). Luego, se obtuvieron las coordenadas de las regiones geográficas de aislamiento de los *hits* y se los ubicó en mapas utilizando el paquete *leaflet* (Graul, 2016).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Evaluación de la presencia de genes específicos de resistencia a metales

En la **Tabla 3.4** se muestran los resultados obtenidos en las amplificaciones para genes de resistencia a metales, realizadas sobre el ADN genómico de los 25 consorcios expuestos y los 5 consorcios no expuestos a metales.

En algunos casos, la amplificación fue positiva para fragmentos que no se correspondían con la longitud esperada para el gen apuntado, estos casilleros se marcan con un asterisco en la tabla. La indicación (+*) se usó para señalar los casos en los que se observó la banda correspondiente a la longitud esperada pero junto a otras bandas. Esta situación fue detectada en la amplificación del gen *czcA* (272 pb), para la cual se observaron bandas de longitud de 500 pb y menores a 100 pb (de acuerdo con el patrón de peso molecular). Algo similar se observó en la amplificación del gen *copA* (765 pb) que produjo una banda a 650 pb, y en la del gen *pcoA* (147 pb) que mostró una banda a 700 pb. En el caso de ALoSM esta fue la única banda presente al evaluar *pcoA*. Del mismo modo, en la amplificación con *primers* para el gen *czcA*, la muestra SAnZn sólo mostró una banda menor a 100 pb, pero no se obtuvo banda a 272 pb. Esta situación se señala con (-*), lo que indica que no se observó la banda de la longitud esperada, pero sí otra banda de tamaño diferente.

Tabla 3.4 – Amplificaciones por PCR de los genes de resistencia

	<i>cadA</i>	<i>cusA</i>	<i>copA</i>	<i>pcoA</i>	<i>zntA</i>	<i>zitB</i>	<i>czcA</i>	<i>cnr</i>	<i>nccA</i>
ALaSM	-	-	-	+	-	-	+	-	-
ALoSM	-	-	+	-*	-	-	+	-	-
SAaSM	-	-	-	+	-	-	+	-	-
SAoSM	+	-	+	+*	-	-	+	-	-
SAnSM	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ALaCd	-						+		
ALoCd	-						+		
SAaCd	-						+*		
SAoCd	+						+		
SAnCd	-						-		
ALaCo							+	-	-
ALoCo							+*	-	-
SAaCo							+*	-	-
SAoCo							+	-	-
SAnCo							+	-	-
ALaCu			-	-					
ALoCu			+*	-					
SAaCu			-	+					
SAoCu			+	-					
SAnCu			-	-					
ALaNi								-	-
ALoNi								-	-
SAaNi								-	-
SAoNi								-	-
SAnNi								-	-
ALaZn					-	-	+		
ALoZn					-	-	+		
SAaZn					-	-	+*		
SAoZn					-	-	+		
SAnZn					-	-	-*		

El gen *czcA* fue el de mayor presencia entre los consorcios; este gen codifica para la proteína de la membrana interna del sistema de exclusión de tipo CBA *czc* y confiere resistencia a cadmio, zinc y cobalto.

Entre los genes de resistencia a cobre, se observó la presencia de *copA* y *pcoA*, pero no de *cusA*; *copA* es la proteína de la membrana interna del sistema dependiente de ATP que expulsa ion cobre del interior celular al periplasma. Este sistema suele estar acompañado de otros como, por ejemplo, *cus*, *cue* y *pco*, que actúan sobre el cobre libre (no expulsado). La proteína *pcoA* tiene actividad cobre oxidasa y suele estar libre en el periplasma; la proteína *cusA*, en cambio, forma parte de un sistema antiporter de exclusión de tipo CBA.

Respecto a la resistencia a cadmio, además del sistema *czc*, se observó la presencia del gen *cadA* en el consorcio organótrofo de Salto del Agrio (SAoSM y SAoCd). Este gen codifica para la proteína de la membrana interna del sistema de exclusión dependiente de ATP, *cad*.

Los genes específicos para la resistencia a zinc (*zntA* y *zitB*) y los genes para la resistencia a níquel y cobalto (*cnr*), y a níquel, cobalto y cadmio (*nccA*) no fueron detectados para ninguno de los consorcios. De todos modos, la resistencia a zinc y cobalto podría explicarse por la presencia del gen *czcA*. En cambio, no se detectó ningún gen que pudiera explicar la elevada resistencia a níquel observada en los distintos consorcios.

En todos los casos, los genes de resistencia encontrados en los consorcios expuestos estaban también presentes en los consorcios no expuestos de la misma muestra y para el mismo metabolismo. El consorcio anaeróbico, SAnSM, sólo presentó el gen de resistencia *czcA*; este gen fue también detectado en el consorcio resistente a cobalto, SAnCo, que fue el único consorcio organótrofo anaeróbico en el que se encontró presencia de algún gen de resistencia específico.

3.3.2. Diversidad de las comunidades y consorcios

La composición microbiana de todos los consorcios se realizó a través de la secuenciación de amplicones del gen 16S ARNr por *metabarcoding*.

En primer lugar, se analizó el *esfuerzo de muestreo* a través de curvas de rarefacción (**Figura 3.1**). Las curvas muestran la cantidad de secuencias diferentes que se encuentran al ir aumentando el tamaño de la muestra (el número de secuencias evaluadas); cuando la curva alcanza el *plateau*, se considera que no se encontrarían nuevas secuencias aún si se tomara una muestra más grande, indicando que el muestreo realizado es representativo. A su vez, las curvas de rarefacción dan un indicio de la diversidad de las muestras: cuanto mayor es el valor de la asíntota superior, mayor es la riqueza y, cuanto mayor la pendiente en la primera sección de la curva, menor la dominancia de una especie (mayor equidad).

En la figura puede comprobarse que todas las curvas alcanzaron el *plateau*, confirmando que todas las muestras están bien representadas en sus datos de secuenciación. A su vez, se observa que la comunidad autóctona de Salto del Agrio (SA) presenta una mayor riqueza que el resto de las muestras.

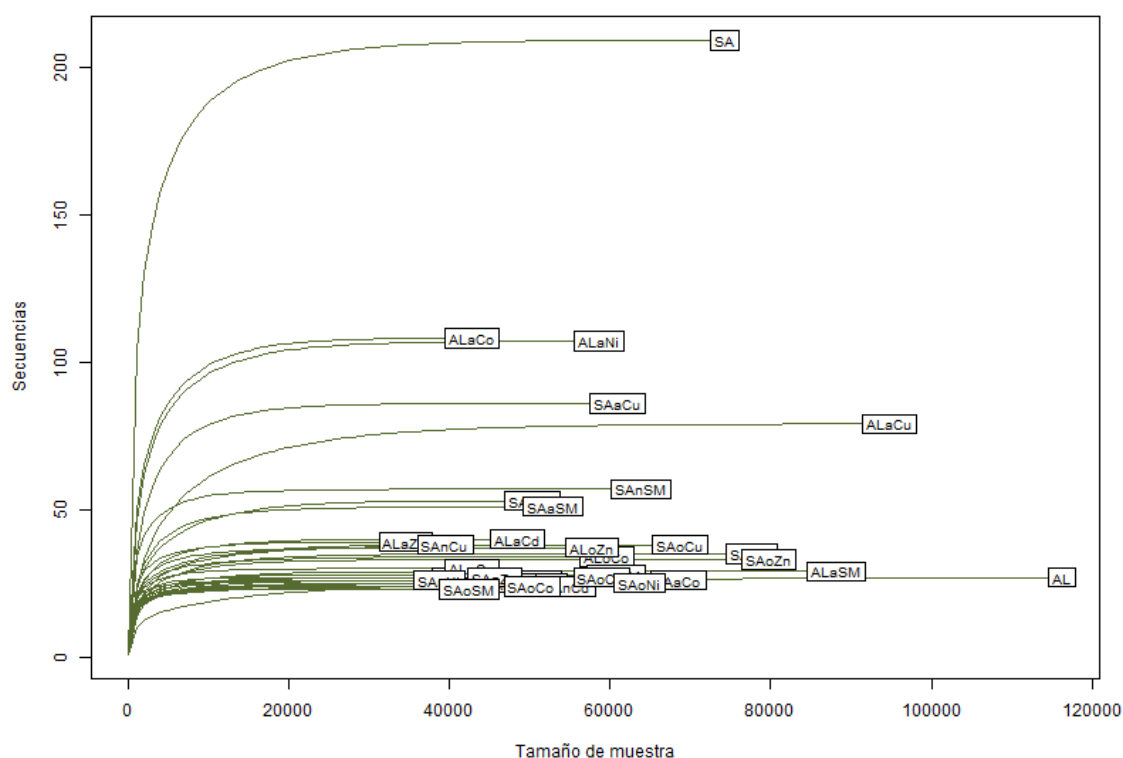


Figura 3.1 – Curvas de rarefacción de las muestras (comunidades y consorcios).

Para evaluar cuantitativamente la diversidad, se utilizaron los índices de Shannon-Wiener y de Simpson (aquí representado como su inverso, $1/\text{Simpson}$), siendo el primero un adecuado indicador de riqueza mientras el segundo lo es de equidad o dominancia.

La **Tabla 3.5** muestra los índices obtenidos según los tres mecanismos de procesamiento utilizados. Si bien los valores absolutos no fueron los mismos, ya que el número total de filotipos, ASVs y OTUs difiere, las relaciones entre las muestras y los análisis que se realizaron sobre ellos arrojaron similares resultados con idénticas conclusiones.

– CAPÍTULO III –

Tabla 3.5 – Índices de diversidad alfa calculados para las muestras luego de los distintos procesamientos

	Filotipos		ASVs		OTUs	
	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson	Shannon	Simpson
AL	0,84	1,98	-	-	-	-
ALaSM	1,07	1,95	1,37	2,14	1,32	2,20
ALaCd	0,75	1,49	0,96	1,63	0,71	1,43
ALaCo	1,24	1,64	1,45	1,77	1,16	1,54
ALaCu	0,48	1,19	0,68	1,28	0,53	1,21
ALaNi	1,22	1,77	1,39	1,87	1,17	1,67
ALaZn	1,24	2,60	1,53	2,92	1,32	2,83
ALoSM	0,77	1,51	0,96	1,53	0,64	1,28
ALoCd	1,14	2,35	1,57	2,91	0,99	2,13
ALoCo	0,47	1,18	0,76	1,31	0,61	1,24
ALoCu	1,21	2,51	1,66	3,14	1,09	2,25
ALoNi	0,45	1,16	0,60	1,21	0,47	1,16
ALoZn	0,51	1,19	0,84	1,35	0,88	1,33
SA	3,72	21,72	-	-	-	-
SAaSM	1,51	2,86	1,74	3,12	1,39	2,41
SAaCd	1,04	2,23	1,47	2,91	1,00	2,16
SAaCo	0,21	1,06	0,46	1,19	0,29	1,08
SAaCu	0,93	1,46	1,51	2,25	1,00	1,47
SAaNi	0,89	2,11	1,04	2,23	0,85	1,94
SAaZn	0,92	2,01	1,41	2,79	0,83	1,88
SAoSM	1,58	3,18	1,86	3,52	1,61	2,98
SAoCd	0,27	1,08	0,64	1,27	0,37	1,11
SAoCo	0,72	1,52	0,95	1,56	0,42	1,13
SAoCu	0,30	1,09	0,65	1,24	0,56	1,21
SAoNi	0,67	1,46	0,89	1,50	0,44	1,13
SAoZn	0,28	1,09	0,66	1,25	0,53	1,18
SAnSM	2,38	8,05	2,72	9,49	2,51	8,45
SAnCd	1,33	2,19	1,63	2,53	1,33	2,15
SAnCo	1,57	3,69	2,20	6,25	1,56	3,38
SAnCu	1,09	2,30	1,32	2,55	1,08	2,29
SAnNi	1,57	3,07	1,79	3,38	1,57	3,08
SAnZn	1,29	2,63	1,73	3,34	1,50	3,13

En coincidencia con lo que indica la curva de rarefacción, la comunidad de SA mostró mayor diversidad alfa que el resto de las muestras, presentando mayor cantidad de taxones (riqueza) y mayor equidad en sus abundancias.

En la **Tabla 3.6** se indican los resultados sobre la significancia de las diferencias en la diversidad alfa para los consorcios de cada sitio según su metabolismo. Aunque los resultados de la tabla corresponden a los datos procesados según la metodología de ASVs, el análisis con los datos procesados en OTUs y el análisis de filotipos arrojaron resultados y conclusiones similares. En algunos casos se obtuvieron p-valores entre 0,01 y 0,05 que suelen ser los valores de corte utilizados en la literatura y los recomendados para determinar significancia estadística. En este trabajo de tesis se utilizó el valor de corte más estricto (0,01), los resultados que no cumplieron esa condición no fueron tenidos en cuenta en la elaboración de las conclusiones aquí desarrolladas; no obstante, en la tabla se muestran en cursiva los resultados que se hubieran obtenido si se proseguía con el análisis posterior. En la columna de Tukey se muestra la visualización de letras compactas (*compact letter display, cld*) del análisis *post-hoc*; en este sistema, letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos, mientras que la presencia de una letra en común previene de afirmar que existen diferencias, así, *a* es diferente de *b* pero no es diferente de *ab*.

Tabla 3.6 – Test estadísticos para evaluar estadísticamente las diferencias en la diversidad alfa en función del metabolismo seleccionado

Muestra	Índice	p-val		
		MANOVA	Metabolismo	Tukey
AL	Shannon	>0,1		
	Simpson	>0,1		
SA	Shannon	0,01591	<i>Acidófilo</i> <i>Organótrofo</i> <i>Anaeróbico</i>	<i>b</i> <i>ab</i> <i>a</i>
	Simpson	0,00728	Acidófilo Organótrofo Anaeróbico	b ab a

Los consorcios de Agua de Limón mostraron diversidad alfa del mismo orden que la comunidad autóctona (AL) y el análisis multivariante de varianza no reveló diferencias significativas entre ellos. En cambio, el análisis de varianza reveló significancia para el índice de Simpson ($p\text{-val} < 0,01$) entre los consorcios obtenidos a partir de la comunidad de SA en los tres metabolismos. El test *post-hoc* de Tukey mostró que los consorcios organótrofos anaeróbicos poseían mayor equidad (mayor $1/\text{Simpson}$) que los consorcios acidófilos de esta muestra.

La **Tabla 3.7** muestra los resultados del análisis sobre la significancia de las diferencias en la diversidad alfa entre los consorcios expuestos a metal y los no expuestos. En ninguna de las pruebas se rechazó la hipótesis nula sobre la inexistencia de diferencias entre los índices de diversidad (α) ($p\text{-val} > 0,01$); de todos modos, se observó una tendencia a mayor diversidad en los consorcios no expuestos de SA respecto de los expuestos a metales.

Tabla 3.7 – Test estadísticos para evaluar estadísticamente las diferencias en la diversidad alfa en función de la exposición a metales

Muestra	Índice	p-val MANOVA	Condición	Ln(α)	p-val Test t
AL	Shannon	>0,1			
	Simpson	>0,1			
SA	Shannon	0,04219	Sin metal	0,725	0,01671
			Metal	0,108	
	Simpson	0,02473	Sin metal	1,54	0,1454
			Metal	0,76	

3.3.3. Comparación del perfil microbiano de las comunidades autóctonas y sus respectivos consorcios

En función de comparar la composición de los consorcios y las comunidades autóctonas, el perfil microbiano de las muestras fue analizado, en primera instancia, como filotipos. La **Figura 3.2** muestra la abundancia de los filotipos al nivel de filus en las 32 muestras.

Se encontraron 34 filus entre los cuales Firmicutes fue el más abundante (57% de las secuencias analizadas fueron asignadas a este filo) seguido por Proteobacteria (26%), Euryarchaeota (9%), Actinobacteria (3%) y Bacteroidetes (1%). Firmicutes fue dominante en los consorcios organótrofos, mientras que Proteobacteria mostró una abundancia importante en los consorcios litótrofos acidófilos. En una sección posterior, se realizará un análisis más exhaustivo sobre la composición de las comunidades y consorcios y sobre la ocurrencia de los taxones. En coincidencia con el análisis previo de diversidad, la muestra autóctona de SA mostró una mayor cantidad de filus (riqueza) que el resto de las muestras.

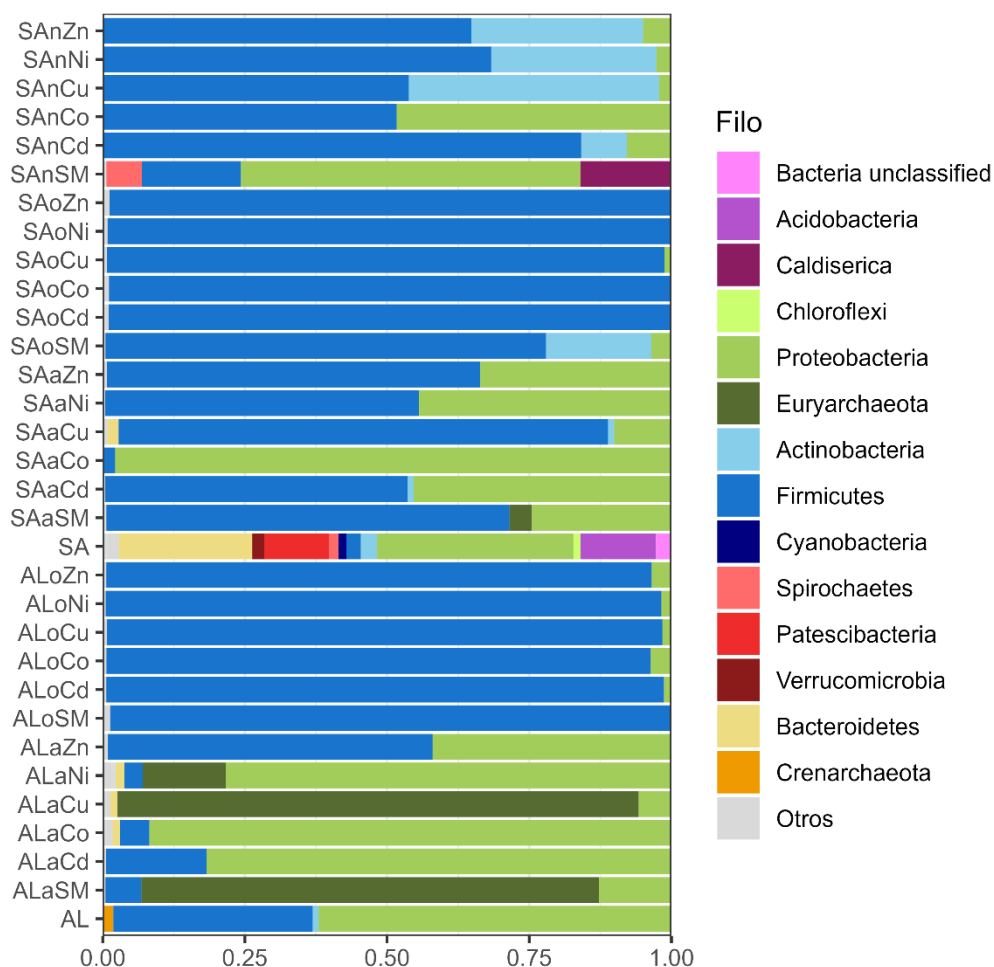


Figura 3.2 – Abundancia relativa de filós en las comunidades y consorcios según el análisis de filotipos

Para comparar los perfiles microbianos de las muestras, se calcularon los coeficientes de disimilitud de Bray-Curtis (distancias) y se construyó una matriz de distancias. A partir de ella, se realizó un escalado dimensional no métrico (NMDS) que ordena las muestras en un plano de acuerdo con un *ranking* de distancias/similitudes; la distancia entre dos puntos en el plano no es proporcional a su disimilitud (el coeficiente de Bray-Curtis en este caso) sino que es correspondiente a su ubicación en el *ranking* construido a partir de estos coeficientes. Se trata de un ordenamiento libre sobre el cual no se ha hecho ninguna suposición previa, por lo que resulta útil para explorar posibles modelos de ordenamiento.

La **Figura 3.3** muestra el NMDS de las muestras de acuerdo con sus distancias evaluadas sobre las composiciones de filotipos a nivel género. La solución del ordenamiento se alcanzó con un valor de *stress* de 0,199, lo cual es aceptable considerando la cantidad de puntos representados.

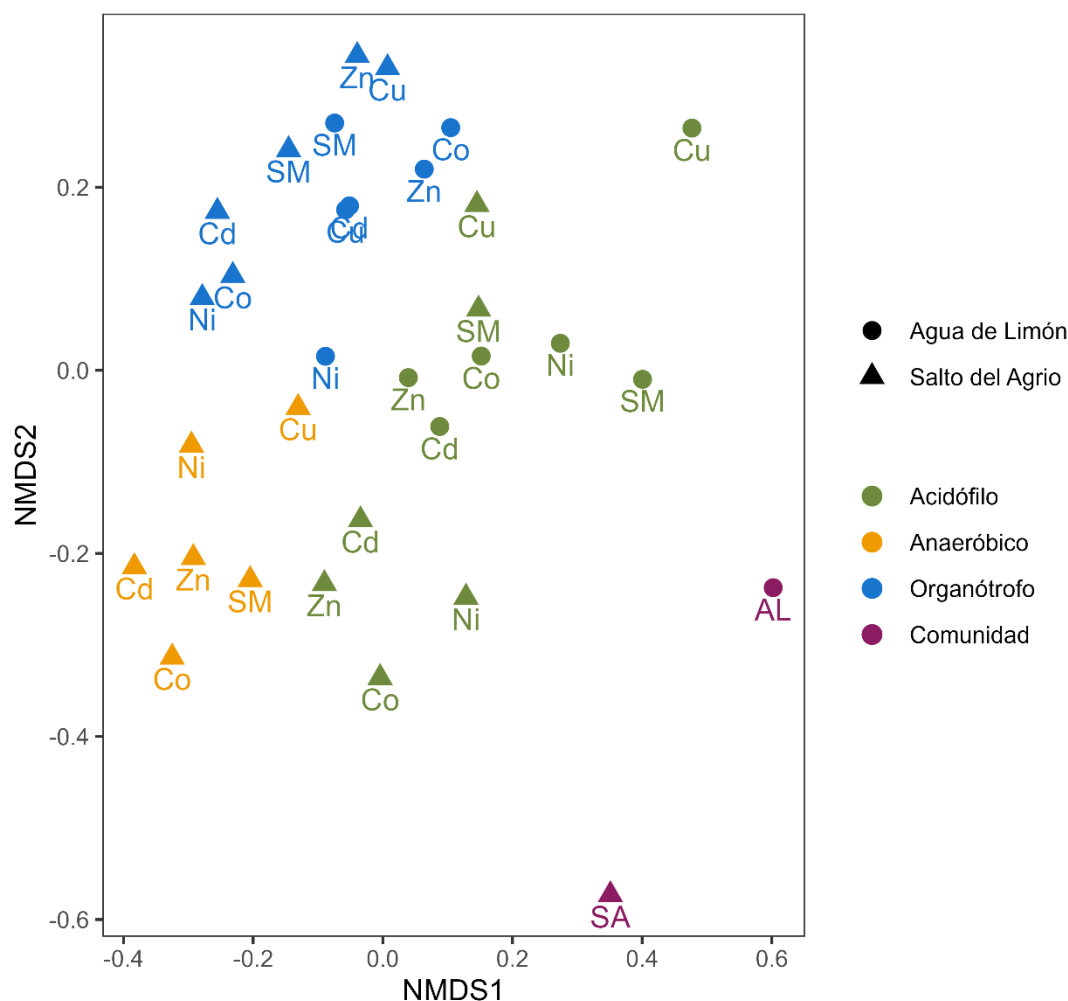


Figura 3.3 – Escalado dimensional no métrico (NMDS) a partir de las disimilitudes entre los perfiles taxonómicos de las comunidades (en violeta) y los consorcios.

En la figura puede verse que ambas comunidades autóctonas (SA y AL) se ubicaron alejadas de los consorcios, sugiriendo diferencias importantes en la composición microbiana de estos últimos respecto de las muestras ambientales. Por su parte, los consorcios parecieron agruparse de acuerdo con su metabolismo

sin observarse distinción significativa entre los consorcios expuestos a metal y los no expuestos (SM).

Los consorcios litótrofos acidófilos se ubicaron más cerca de las comunidades autóctonas que los consorcios de los otros dos metabolismos. Para evaluar esta observación, se tomaron las distancias (los coeficientes de Bray-Curtis) entre los consorcios y sus respectivas comunidades originales (AL o SA) y se calculó si existían diferencias significativas con el test de Kruskal-Wallis (ya que, según la prueba de Levene, la dispersión de los datos no cumplía la condición de homocedasticidad necesaria para un análisis paramétrico). La **Tabla 3.8** muestra los resultados de la prueba no paramétrica que se realizó considerando el origen y el metabolismo de cada consorcio; en ella se incluye el valor promedio de los coeficientes de Bray-Curtis (cada grupo consistía en 6 consorcios), la desviación estándar de ese promedio, la posición promedio en el *ranking* del test de Kruskal-Wallis y el símbolo de letras compactas (cld) según su significancia ($\alpha=0,01$).

Tabla 3.8 – Test estadístico de Kruskal-Wallis para disimilitudes entre consorcios y comunidades en función del metabolismo favorecido

Origen	Metabolismo	Distancia	DE	Ranking	KW
Agua de Limón	Acidófilo	0,70	0,20	7,5	a
	Organótrofo	0,99	0,00	24,5	b
Salto del Agrio	Acidófilo	0,98	0,00	9,6	a
	Anaeróbico	0,99	0,00	15,6	ab
	Organótrofo	0,98	0,01	20,16	ab

El test determinó que efectivamente los consorcios litótrofos acidófilos eran los más cercanos (con mayor similitud o menor disimilitud) a la comunidad autóctona; no obstante, sólo para los acidófilos de AL esa similitud con la comunidad original era significativa en comparación con la que presentaban los respectivos consorcios aeróbicos organótrofos. Los consorcios de SA no presentaban diferencias significativas en cuanto a su disimilitud respecto a la comunidad original.

3.3.4. Comparación de perfiles filogenéticos entre consorcios

Para analizar y comparar el perfil filogenético de los consorcios, se utilizaron dos metodologías de procesamiento de datos de secuenciación, OTUs y ASVs. El análisis de OTUs (realizado en MOTHUR) entregó 4217 OTUs entre todos los consorcios, mientras que el análisis de ASVs (realizado en DADA2) formó 749 ASVs. A pesar de esta diferencia, como se verá más adelante, los resultados obtenidos en los análisis posteriores fueron similares, tanto para los valores de diversidad alfa (**Tabla 3.5**) como para los de disimilitud, por lo que las conclusiones alcanzadas fueron similares en ambos casos. Además, las conclusiones fueron similares a las alcanzadas a través del análisis de filotipos como se puede observar en la similitud de los gráficos de NMDS en cada caso.

La **Figura 3.4** muestra los NMDS obtenidos con los datos procesados según ambas metodologías.

En coincidencia con el análisis previo, se observó que los consorcios se agrupaban de acuerdo con su metabolismo sin apreciarse un efecto significativo por la exposición a metales. Para corroborar esta hipótesis, se realizó un análisis multivariado de varianza por permutaciones (PERMANOVA) para testear el modelo que considera el metabolismo de cada consorcio anidado a su origen.

$$y = Origen + Metabolismo_{(origen)} + NumSeq + \varepsilon \quad (3.2)$$

En este modelo *Origen* es una variable categórica de valores *Agua de Limón/Salto del Agrio*, *Metabolismo* es una variable categórica de valores *Acidófilo/Anaeróbico/Organótrofo* y *NumSeq* es una variable continua que contiene el número de secuencias en cada consorcio (el tamaño de cada muestra). Esta última variable evalúa la influencia de utilizar las abundancias crudas en el análisis sin haber realizado algún tipo de normalización sobre los datos.

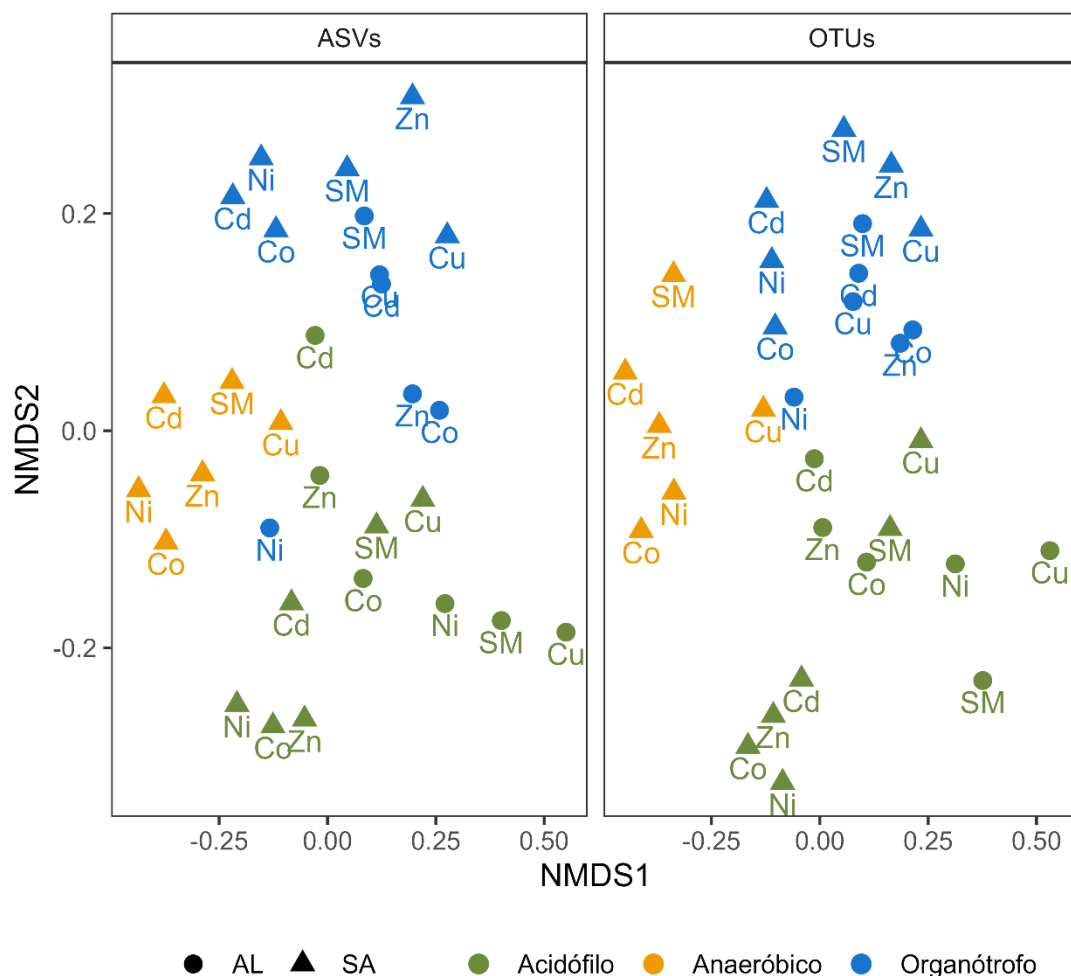


Figura 3.4 – NMDS a partir de matriz de disimilitud entre consorcios. Coeficientes de Bray-Curtis calculados utilizando las abundancias de los datos procesados según ASVs y según OTUs.

El análisis de este modelo arrojó que las tres variables eran significativas ($p\text{-val} < 0,01$): 10% de la ordenación podría explicarse únicamente a partir del origen del consorcio mientras que el 32% puede explicarse si se considera el metabolismo de cada uno. En cambio, las diferencias del tamaño de muestra entre consorcios sólo podrían explicar el 5,6% del ordenamiento. El residual del modelo fue 0,52, lo que sugiere que el modelo representado por la **ecuación 3.2** puede explicar 48% de las diferencias observadas entre los perfiles filogenéticos de los consorcios, siendo el metabolismo favorecido (las condiciones del cultivo) el determinante de mayor peso.

En el análisis exploratorio del NMDS no se observó una tendencia clara respecto al efecto del metal en los consorcios. No obstante, se evaluaron las distancias (los coeficientes de Bray-Curtis) de los consorcios expuestos respecto a los no expuestos. Para ello, se analizó la distancia según el metabolismo; por ejemplo, si la distancia entre los cinco consorcios acidófilos de SA expuestos a metales respecto al consorcio acidófilo no expuesto era significativamente diferente a la distancia entre los cinco consorcios organótrofos aeróbicos resistentes de SA respecto al consorcio no expuesto. Además, se evaluó si la disimilitud respondía a la naturaleza del metal, es decir, por ejemplo, si la distancia entre los tres consorcios expuestos a cadmio en SA respecto a sus respectivos consorcios no expuestos era estadísticamente diferente a la distancia calculada entre los tres consorcios expuestos a cobre y los consorcios no expuestos correspondientes.

La **Tabla 3.9** muestra los resultados del test de Kruskal-Wallis al agrupar los consorcios de acuerdo con su metabolismo y la **Tabla 3.10** muestra los resultados al analizar las distancias en función del metal al que fueron expuestos independientemente del metabolismo. En ambas tablas se exhibe la distancia promedio de la agrupación, la desviación estándar (DE), la ubicación promedio en el *ranking* del test y su significancia (KW) ($\alpha=0,01$).

Tabla 3.9 – Resultado del test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis para distancias entre consorcios expuestos y no expuestos en función del metabolismo

Origen	Metabolismo	Distancia	DE	Ranking	KW
Agua de Limón	Acidófilo	0,79	0,27	13,4	a
	Organótrofo	0,8	0,19	12,2	a
Salto del Agrio	Acidófilo	0,67	0,16	6,2	a
	Anaeróbico	0,91	0,06	14,4	a
	Organótrofo	0,83	0,07	18,8	a

Tabla 3.10 – Resultado del test de Kruskal-Wallis para diferencias en la disimilitud entre consorcios expuestos y no expuestos según el metal utilizado

Metal	Distancia	DE	Ranking	KW
Cd	0,81	0,16	13,2	a
Co	0,72	0,07	12,6	a
Cu	0,86	0,27	11,8	a
Ni	0,79	0,22	11,8	a
Zn	0,88	0,12	15,6	a

En ninguna de las dos evaluaciones se determinaron diferencias significativas: es decir, el estrés por presencia de metales no causó más/menos cambios en el perfil microbiano de un metabolismo en particular respecto del provocado en los otros; y, además, no se determinó que la naturaleza del metal tuviera efecto sobre el perfil taxonómico del consorcio.

3.3.5. Inferencia metabólica

El *pipeline* de PAPRICA fue utilizado para inferir las rutas metabólicas y las potenciales funciones de los consorcios y comunidades a partir de su composición filogenética. La **Figura 3.5** muestra el *heatmap* de las abundancias relativas de rutas metabólicas en un microorganismo representativo de cada muestra. Se trata de un análisis global con el objetivo de comparar los perfiles funcionales de los consorcios y las comunidades. A la izquierda se muestra el dendrograma obtenido al realizar una clusterización jerárquica.

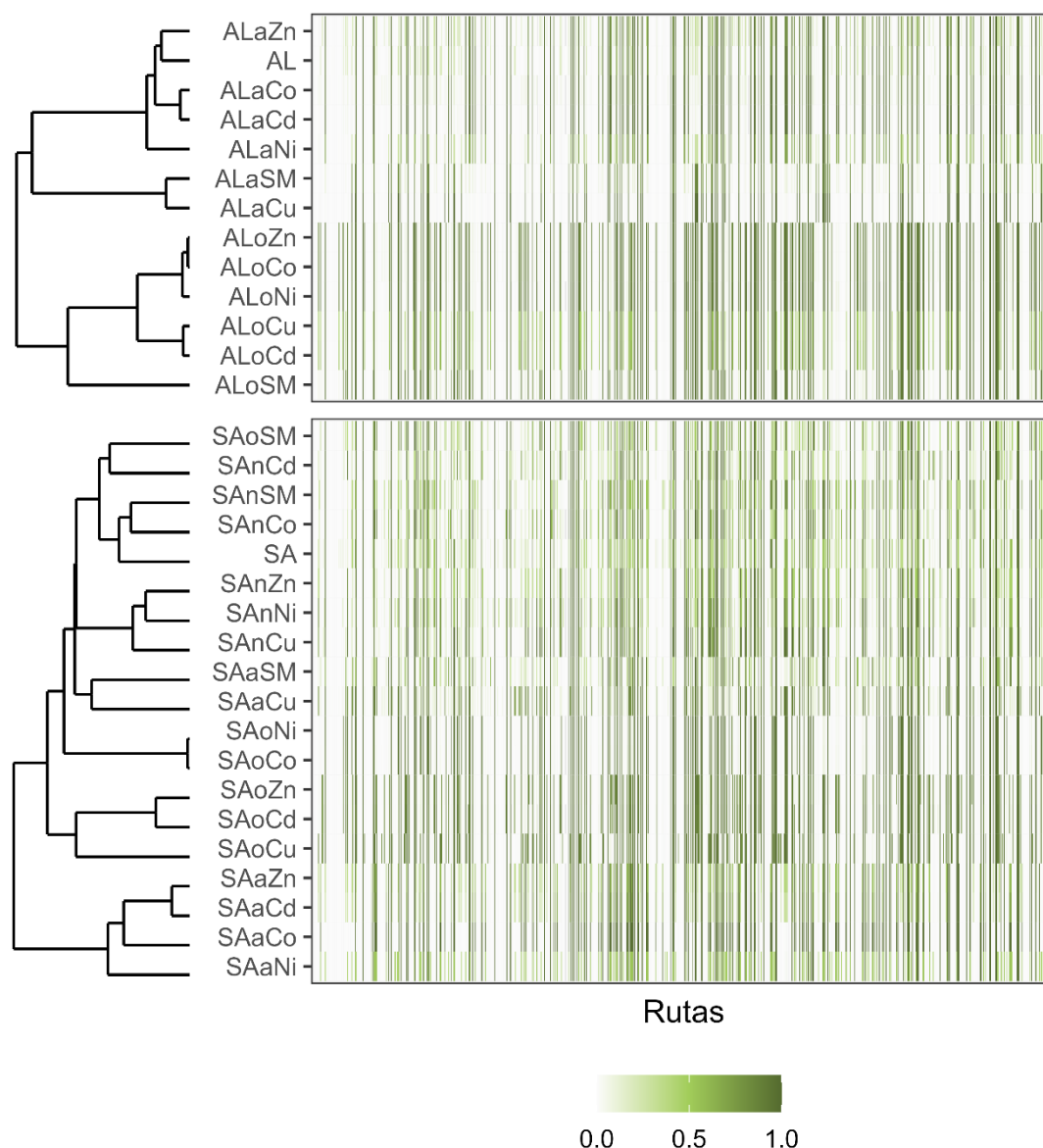


Figura 3.5 – Heatmap de la presencia de rutas metabólicas en las muestras y dendrograma por clúster jerárquico según sus similitudes.

El análisis evidenció diferentes patrones para cada metabolismo, especialmente en las muestras de AL, donde los consorcios acidófilos mostraron abundancia de menos rutas que los organótrofos y ambos patrones resultaron claramente diferenciables. Por otro lado, en las muestras de SA, los patrones resultaron menos evidentes, pero de todas formas se apreció una tendencia de los *clusters* dirigida por el metabolismo. La clusterización mostró que la comunidad autóctona de AL era funcionalmente similar a los consorcios

acidófilos, mientras que la comunidad autóctona de SA se mostró funcionalmente más cercana a los consorcios anaeróbicos.

La **Tabla 3.11** muestra la cantidad de rutas metabólicas inferidas presentes (aquellas con abundancia mayor a 0) en cada muestra. Si bien la comunidad de SA mostró mayor cantidad de rutas que la comunidad de AL, en promedio, las muestras de ambos orígenes presentaron cantidades similares y no se observó ninguna tendencia en función del metabolismo o la exposición metálica. Vale mencionar que en el *heatmap* se aprecian menos rutas abundantes en los consorcios litótrofos acidófilos de AL que en los organótrofos de esa muestra; sin embargo, la cantidad de rutas neta fue similar, sugiriendo una selección en favor de ciertas funcionalidades, pero sin la desaparición completa de las otras.

Tabla 3.11 – Cantidad de rutas metabólicas con abundancia mayor a 0 en las muestras

Muestra	Núm. de rutas	Muestra	Núm. de rutas
AL	532	SA	663
ALaSM	539	SAaSM	593
ALaCd	597	SAaCd	636
ALaCo	686	SAaCo	538
ALaCu	659	SAaCu	653
ALaNi	674	SAaNi	572
ALaZn	563	SAaZn	528
ALoSM	559	SAnSM	568
ALoCd	529	SAnCd	527
ALoCo	552	SAnCo	492
ALoCu	523	SAnCu	604
ALoNi	525	SAnNi	486
ALoZn	544	SAnZn	505
		SAoSM	537
		SAoCd	523
		SAoCo	524
		SAoCu	589
		SAoNi	500
		SAoZn	555
	576		558
			PROMEDIO

3.3.6. Análisis de correlaciones de la diversidad alfa

Se evaluaron las posibles correlaciones entre la diversidad alfa de los consorcios y sus niveles de tolerancia a metales pesados y entre la diversidad y la capacidad funcional (expresada en función de la cantidad de rutas metabólicas predichas, es decir, con abundancia mayor a 0 en el análisis por PAPRICA).

En las **Figuras 3.6 A y B** se muestran los resultados de la primera correlación; los valores del coeficiente rho del test de correlación de Spearman fueron -0,10 (p-valor=0,63) y -0,05 (p-valor=0,79) para el índice de Shannon y el índice de Simpson inverso, respectivamente. La correlación entre la diversidad y la capacidad funcional se muestra en las **Figuras 3.6 C y D**; en este caso, los valores del coeficiente fueron -0,21 (p-valor=0,29) y 0,24 (p-valor=0,23) para el índice de Shannon y el inverso de Simpson, respectivamente. En todos los casos, los p-valores no permiten rechazar la hipótesis nula de que el valor de rho es igual a cero, es decir, no es posible probar que exista una correlación entre la diversidad alfa y la tolerancia, ni entre la diversidad y la capacidad metabólica para estos consorcios.

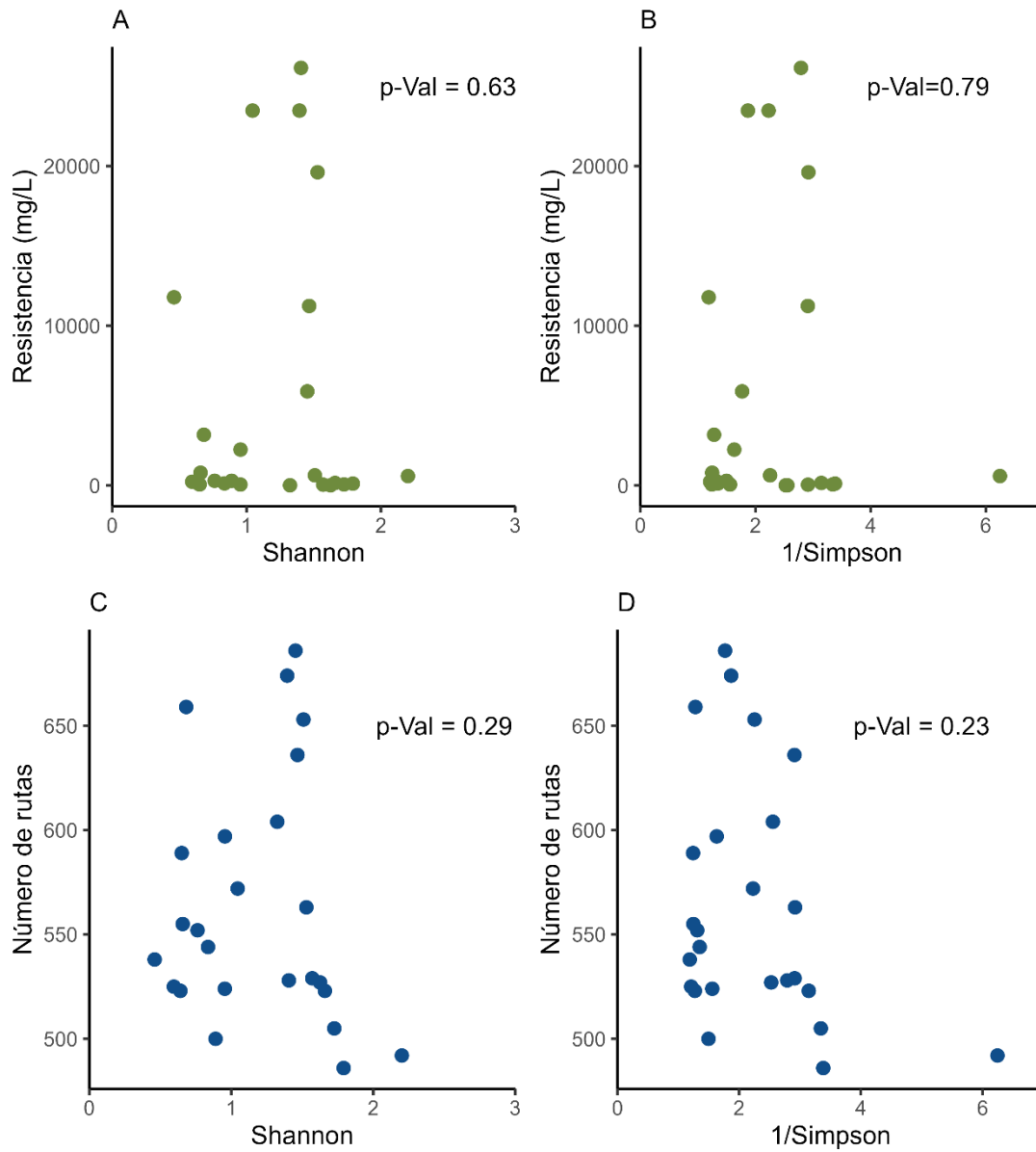


Figura 3.6 – Correlación entre la resistencia a metales observada en los consorcios resistentes y su diversidad alfa (A y B); y correlación entre la cantidad de rutas metabólicas inferidas y los índices de diversidad alfa (C y D). Se muestra el p-valor para el coeficiente de correlación de Spearman correspondiente.

3.3.7. Ocurrencia y prevalencia de taxones

Se analizó la ocurrencia de los filotipos en las comunidades autóctonas y en los consorcios según su metabolismo (6 consorcios en cada uno) y se determinaron los taxones con mayores abundancias totales para cada muestra (Figuras 3.7 y 3.8).

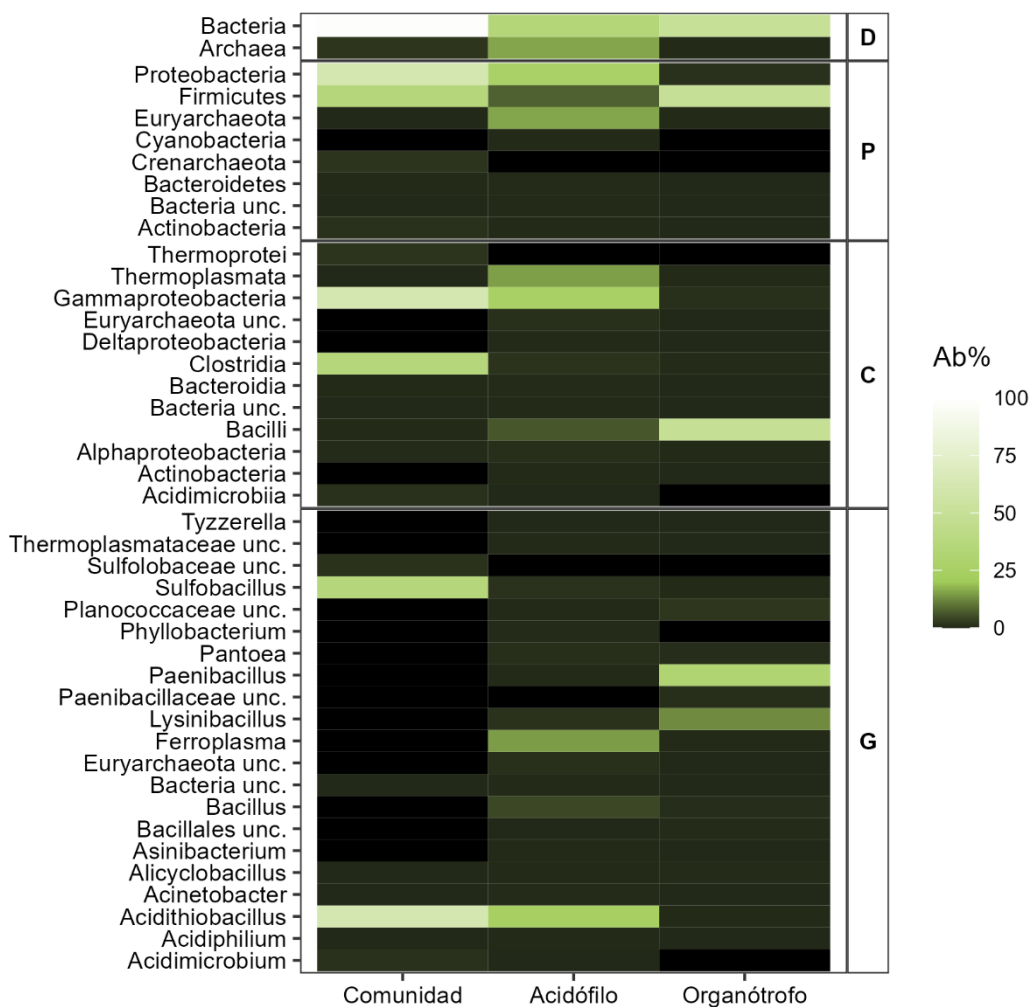


Figura 3.7 – Abundancia relativa porcentual de filos a distintos niveles taxonómicos (dominio (D), filo (P), clase (C) y género (G)) para la comunidad autóctona de AL y los consorcios agrupados según su metabolismo seleccionado independientemente de su resistencia.

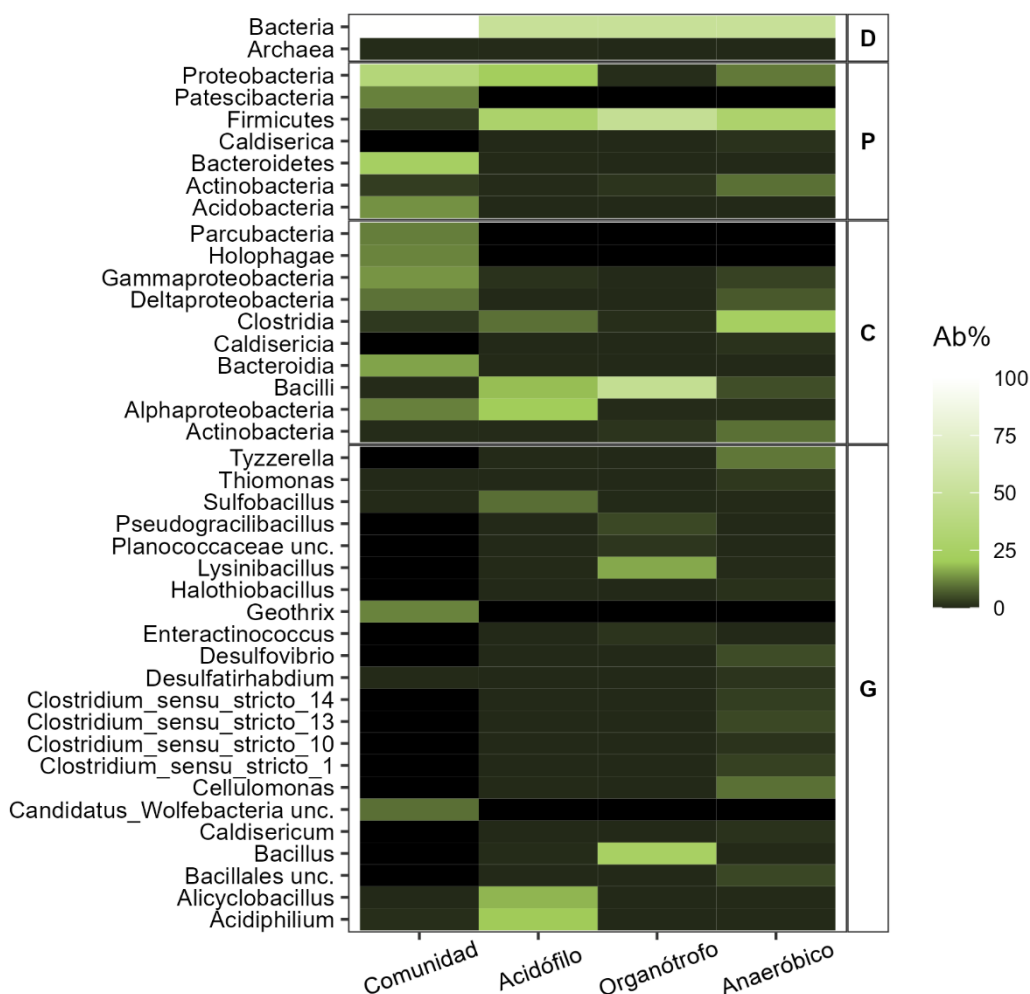


Figura 3.8 – Abundancia relativa porcentual de filos a distintos niveles taxonómicos (dominio (D), filo (P), clase (C) y género (G)) para la comunidad autóctona de SA y sus consorcios derivados agrupados según su metabolismo seleccionado independientemente de la exposición a metales.

En primera instancia se analizó la composición de las comunidades autóctonas; esta descripción se realizó en base al análisis de ASVs clasificados según la base de datos de Silva (v132).

La secuenciación de la muestra ambiental de AL reportó la mayor cantidad de secuencias limpias analizadas (116 319 secuencias), sin embargo, mostró una cantidad relativamente baja de ASVs (60). Tan sólo dos filos representaron el 97% de la diversidad de la muestra: Proteobacteria (62,02%) y Firmicutes (35,06%). El 3% restante estuvo compuesto por Crenarchaeota (1,57%), Actinobacteria (1,06%), Bacteroidetes (0,12%), Diapherotrites (0,09%),

Euryarchaeota (0,06%), unclassified Archaea (0,02%), Verrucomicrobia y unclassified Bacteria (ambos con abundancia menor a 0,01%).

La secuenciación de SA resultó en una menor cantidad de secuencias limpias luego del procesamiento (74 276 secuencias), pero mostró una mayor cantidad de ASVs (614). En este caso, y coincidiendo con la muestra de AL, Proteobacteria fue el filo más abundante (34,50%). Los otros filios abundantes fueron: Bacteroidetes (23,48%), Acidobacteria (13,29%) y Patescibacteria (11,33%). El porcentaje restante de la comunidad estuvo distribuido entre 21 filios, todos de baja abundancia (menor al 3%): Actinobacteria (2,86%), unclassified Bacteria (2,71%), Firmicutes (2,55%), Verrucomicrobia (2,14%), Spirochaetes (1,65%), Cyanobacteria (1,40%), Chloroflexi (1,25%), WPS-2 (0,89%), Armatimonadetes (0,61%), Armatimonadetes (0,28%), Fibrobacteres (0,27%), Gemmatimonadetes (0,20%), Nitrospirae (0,19%), Euryarchaeota (0,11%), FCPU426 (0,09%), Dependientiae (0,06%), Planctomycetes (0,045%), Elusimicrobia (0,02%), WS4 (0,02%), Lentisphaerae and Chlamydiae (ambos representando menos del 0,01%).

A nivel género, la comunidad de AL estuvo dominada por *Acidithiobacillus* (61,67%) y *Sulfobacillus* (34,94%). En cambio, la comunidad de SA no mostró una especie dominante, siendo *Geothrix*, representando el 11,56%, el género más abundante. Se encontraron aproximadamente 30 géneros con abundancias mayores al 1%; entre ellos, se destacan los géneros del filo propuesto *Wolfbacteria* (9,19%), *Paludibacter* (6,82%), *Anaeromyxobacter* (4,87%), *Rhodovastum* (1,70%), *Acidocella* (1,48%) y *Geobacter* (1,36%).

En el análisis de la composición de los consorcios de acuerdo con su metabolismo, el dominio Bacteria fue el predominante en todos los casos. Las arqueas sólo estuvieron presentes con cierta relevancia en los consorcios litótrofos acidófilos de AL. En los consorcios organotróficos, Firmicutes fue prácticamente el único filo relevante, siendo Bacilli la clase más abundante representada por microorganismos del género *Bacillus* y *Lysinibacillus* en SA, y por *Paenibacillus* en AL. En los consorcios litótrofos acidófilos, además de

Firmicutes, se presentó el filo Proteobacteria, siendo *Acidiphilium*, *Alicyclobacillus* y *Sulfobacillus* los géneros más abundantes en SA, y *Acidithiobacillus* y *Ferroplasma* – el único género de arquea abundante – los representativos en los consorcios de AL. Los consorcios anaeróbicos mostraron un perfil mucho más diverso con abundancia de Clostridia, Actinobacteria, delta- y gamma-proteobacteria.

Luego, se analizó la ocurrencia de las secuencias (ASVs sin ser agregados por taxonomía) en cada uno de los consorcios.

En los *heatmap* (**Figuras 3.9 y 3.10**) se muestra la abundancia relativa en los consorcios de los ASVs con abundancia mayor al 10%. Al nombre del ASV se le agregó la taxonomía asignada, aunque esto no tuvo injerencia en el análisis.

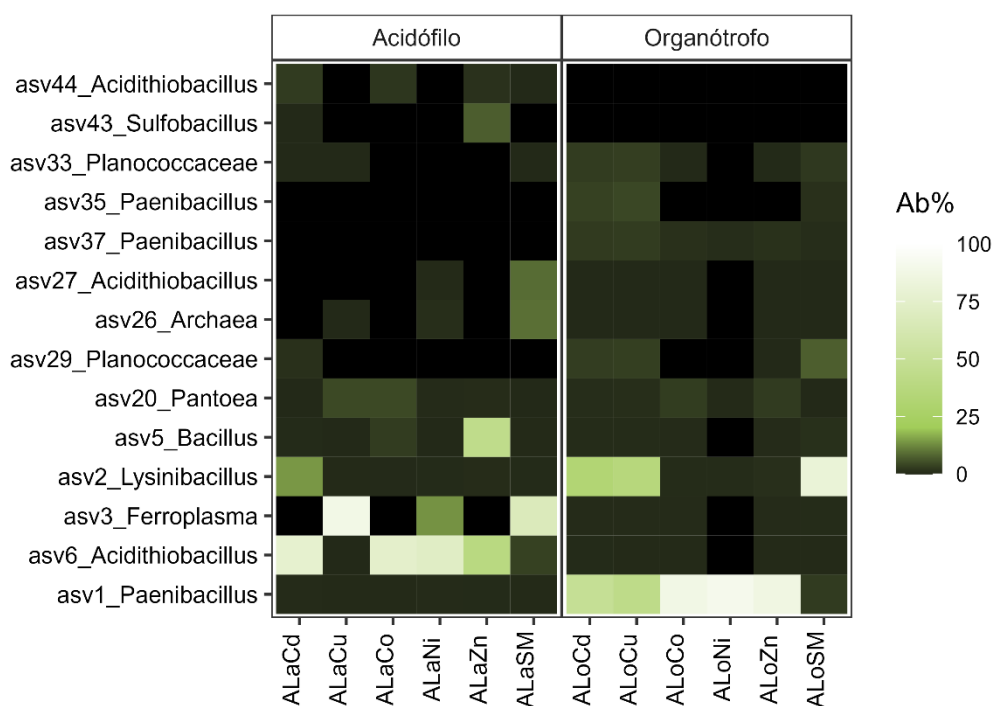


Figura 3.9 – Abundancia relativa porcentual de los ASVs en los consorcios resistentes.

En los consorcios de AL (**Figura 3.9**), se observó que los ASV 1 y ASV 6, clasificados luego como *Paenibacillus azoreducens* y *Acidithiobacillus caldus*, prevalecían en los consorcios expuestos a los metales (o a la mayoría de ellos) en organótrofos y acidófilos respectivamente, pero no eran predominantes en los consorcios no expuestos. Por el contrario, los ASV 2 y ASV 3 fueron predominantes en los consorcios no expuestos. El ASV 3 (clasificado como *Ferroplasma*) dominó también el consorcio acidófilo expuesto a cobre y estuvo presente en el consorcio expuesto a níquel, mientras que en los otros tres consorcios no fue encontrado. Es interesante observar que en los dos consorcios en los que dominó *Ferroplasma*, el ASV 6 (*Acidithiobacillus caldus*) se encontró en muy baja abundancia. Por su parte, el ASV 2 (clasificado como *Lysinibacillus*) mantuvo su abundancia en los consorcios organótrofos expuestos a cadmio y cobre y se vio significativamente disminuido en los otros consorcios. Este ASV también se encontró presente en el consorcio acidófilo resistente a cadmio (ALaCd). El consorcio ALaZn fue el único en que se encontró gran abundancia del ASV 5 (*Bacillus*).

En los consorcios de SA (**Figura 3.10**), varios ASVs mostraron abundancia superior al 10%; no obstante, y a diferencia de lo ocurrido en AL, no se observaron patrones claros. El ASV 4 (*Acidiphilium*) fue prevalente prácticamente en todos los consorcios acidófilos con la excepción del consorcio resistente a cobre, en el cual el ASV 7 (*Alicyclobacillus*) fue dominante. Este último también fue detectado con cierta abundancia en los consorcios SAaCd y SAaZn, mientras que el ASV 4 fue el único presente de modo destacado en el consorcio resistente a cobalto. El consorcio no expuesto a metales (SAaSM) estuvo dominado por los ASV 4 y ASV 8 (*Sulfobacillus*); este último no estuvo presente en los consorcios expuestos, con excepción de SAaNi.

Como se había mencionado previamente, los consorcios anaeróbicos presentaron una mayor cantidad de especies abundantes sin apreciarse alguna tendencia entre ellos. El consorcio no expuesto mostró abundancia de los ASVs 22, 23 y 24, todos ellos ausentes en los consorcios expuestos. El consorcio de este metabolismo que presentó resistencia a cadmio fue dominado únicamente por el

ASV 10, también presente en abundancia en el consorcio resistente a zinc (SAnZn). El consorcio resistente a cobre (SAnCu) estuvo compuesto por dos ASVs mayoritarios, ASV 13 y ASV 15; por el contrario, en el consorcio resistente a cobalto se distinguieron, al menos, cuatro ASVs importantes: 17, 18, 19 y 30. El consorcio expuesto a níquel fue el único con predominancia del ASV 16.

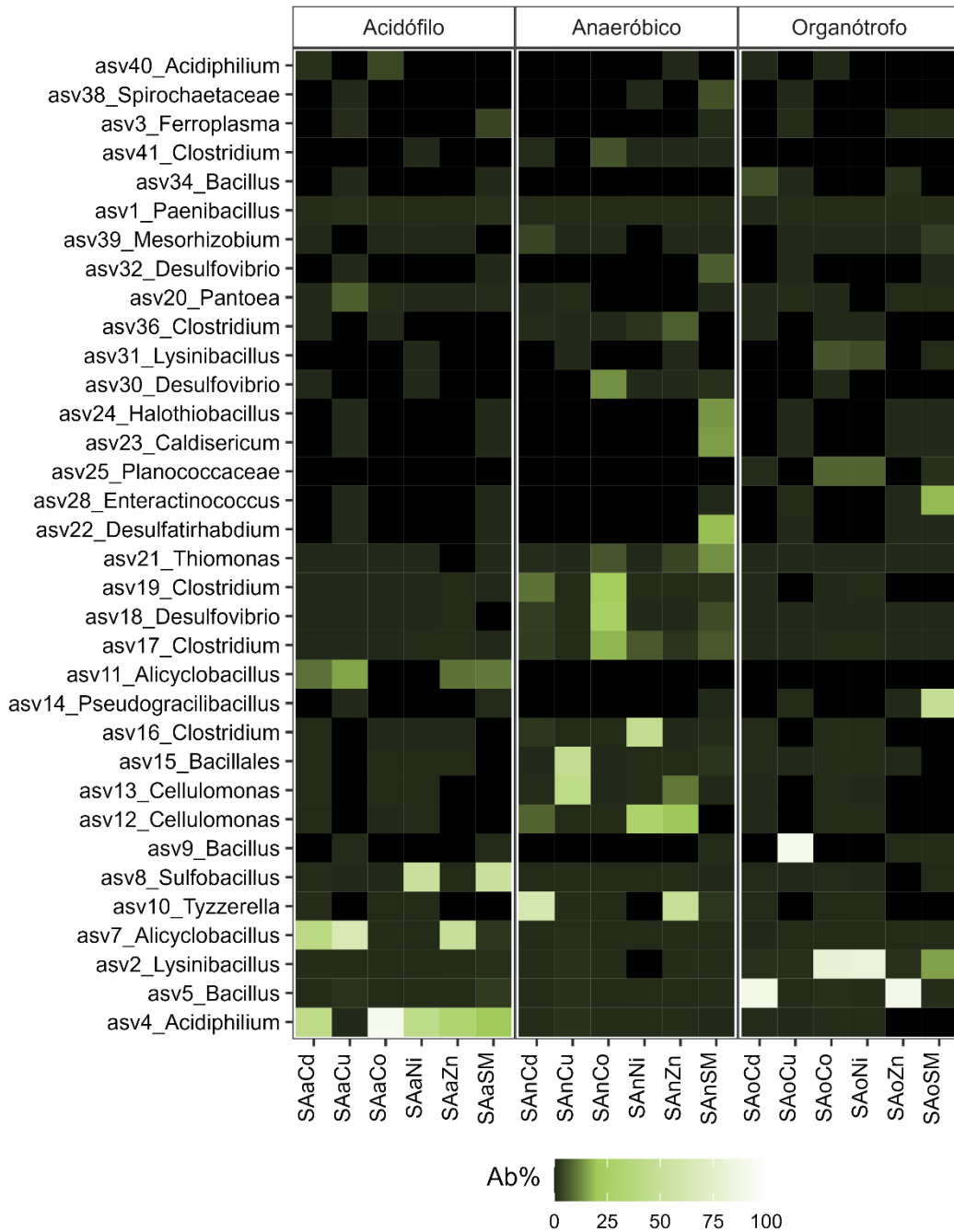


Figura 3.10 – Abundancia relativa porcentual de los ASVs en los consorcios de SA.

En el metabolismo organótrofo de esta muestra se encontraron cinco ASVs con ocurrencia importante. El consorcio no expuesto fue el único con abundancia del ASV 14 (*Pseudogracilibacillus*) y ASV 28 (*Enteractinococcus*). El consorcio resistente a cobre, como se ha indicado previamente, mostró un comportamiento particular en relación con los otros consorcios resistentes; en este caso, fue el único consorcio que mostró prevalencia del ASV 9 (*Bacillus*). El ASV 2 (*Lysinibacillus*) fue dominante en los consorcios resistentes a cobalto y níquel, y también estuvo presente en el consorcio no expuesto. Este ASV, además, había sido destacado en los consorcios organótrofos de la muestra de Agua de Limón. Por su parte, en los consorcios resistentes a cadmio y zinc dominó el ASV 5 (*Bacillus*).

Para identificar posibles taxones (ASVs) con comportamiento diferencial que pudieran tener potencial como indicadores de metales, se calculó el *indicator value* (IndVal) en función de la variable expuesto/no expuesto. A partir de este índice se seleccionaron los ASVs con comportamiento diferencial y se los graficó en *heatmaps* (**Figuras 3.11 y 3.12**) transformando la abundancia relativa con la función logaritmo en base 10 para apreciar diferencias menores.

En los consorcios de Agua de Limón (**Figura 3.11**) se encontró que los ASVs 10, 104, 67 y 128 estaban presentes únicamente en los consorcios expuestos. Todos estos ASVs poseían un IndVal para la presencia de metal de 1,00 con valores de componentes A = 1,00 (especificidad) y B = 1,00 (fidelidad). Como se había observado en la **Figura 3.9**, el ASV 1 estuvo presente en todos los consorcios acidófilos, pero fue fuertemente seleccionado en presencia de metales (IndVal=0,99, A=0,96 y B=1,00); un comportamiento similar se observó para el ASV 6 (IndVal=0,97, A=0,89 y B=1,00).

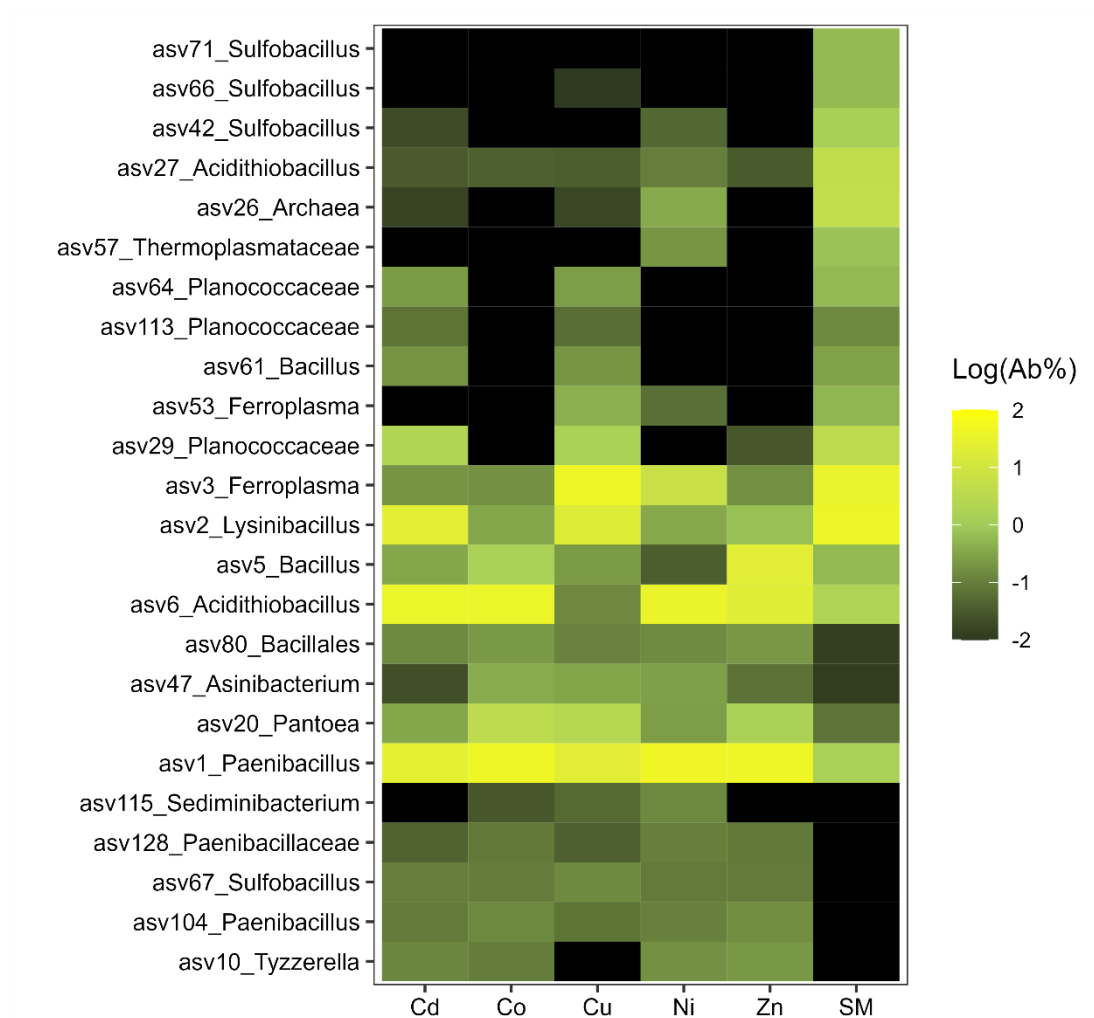


Figura 3.11 – Logaritmo base 10 de la abundancia relativa porcentual de la abundancia de los ASVs en los consorcios resistentes de AL y los no expuestos (SM) ordenados según su IndVal y su abundancia.

En los consorcios de Salto del Agrio (**Figura 3.12**) se encontró que el ASV 12, ASV 36, ASV 95 y ASV 13 estaban solamente presentes en los consorcios expuestos a metales presentando valores de IndVal=1,00. Luego, ASV 5, ASV 16, ASV 7 y ASV 10 se vieron seleccionados favorablemente en presencia de algunos metales alcanzando valores de IndVal de 0,98 en todos los casos. A diferencia de lo observado en AL, los consorcios no expuestos de SA presentaron una gran cantidad de secuencias que no se encontraron en los consorcios expuestos (ASVs 14, 22, 23, 24, 28, entre otros).

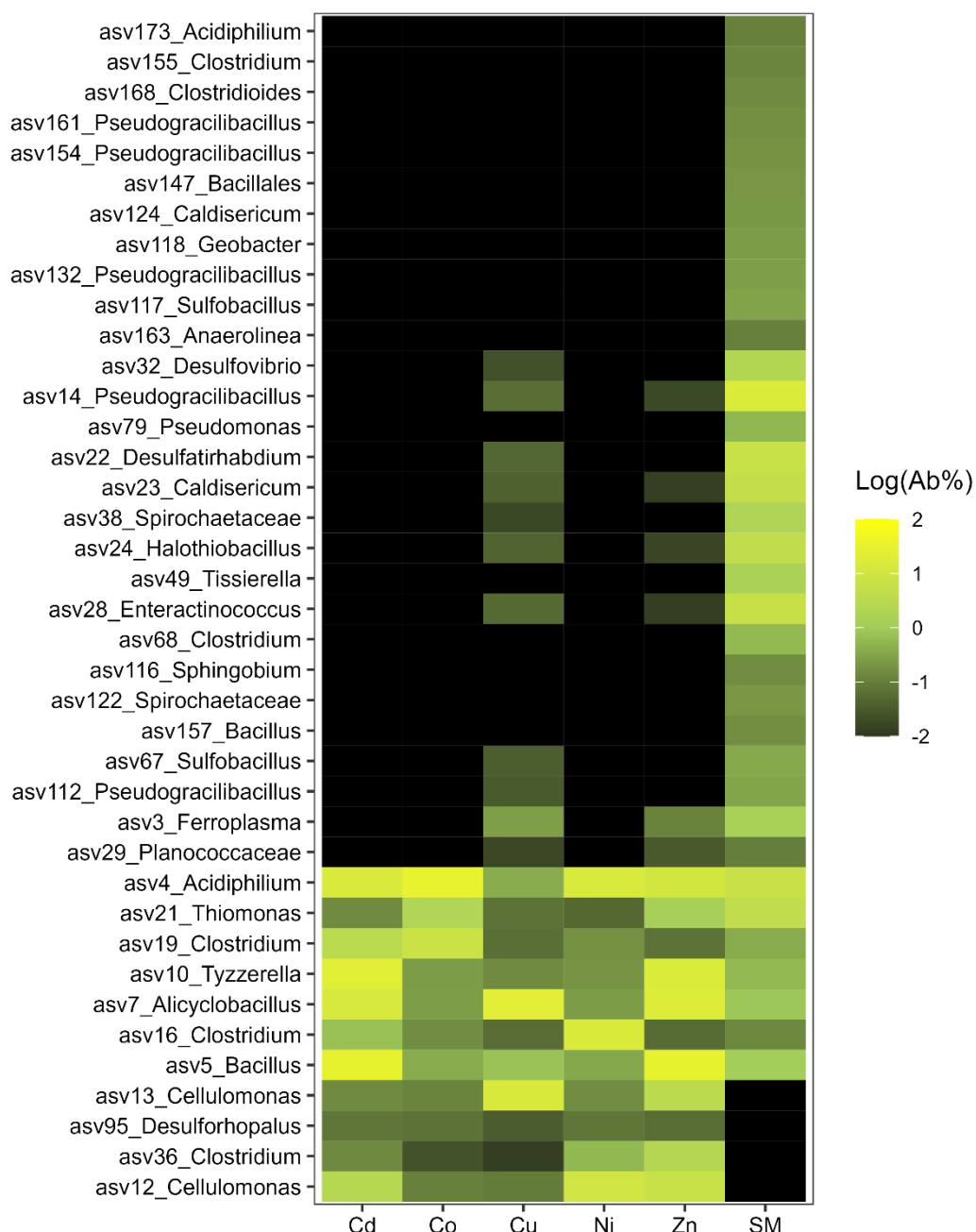


Figura 3.12 – Logaritmo base 10 de la abundancia relativa porcentual de la abundancia de los ASVs en los consorcios resistentes de SA y los no expuestos (SM) ordenados según su IndVal y su abundancia.

Todos estos ASVs serían interesantes de seguir si se pretendiera realizar un proceso de biomonitorio de la región de Cavihue-Copahue. En ese caso, no sólo tienen valor los ASVs seleccionados positivamente (que seguirán siendo evaluados a continuación), sino aquellos ASVs que se pierden ante el estrés metálico, particularmente observados en Salto del Agrio.

3.3.8. Biogeografía de los taxones seleccionados

Este estudio se realizó específicamente con los ASVs que mostraron un comportamiento diferencial positivo frente a la presencia de metal y con los ASVs abundantes en todos los consorcios (con metal y sin metal). En este trabajo consideramos que para que un microorganismo tenga potencial real como indicador debe tener cierta ocurrencia a nivel global, pero únicamente en ambientes expuestos o afectados por metales; por el contrario, microorganismos que se reportan regularmente en ambientes diversos, tanto afectados como prístinos, no tienen valor como indicador aún si fueran fuertemente resistentes a metales ya que su *extrapolación* a nivel global sería dificultosa.

La ocurrencia a nivel global de los ASVs seleccionados se evaluó a través de la búsqueda de secuencias idénticas (realizada con la herramienta BLAST) correspondientes a reportes de microorganismos aislados en el mundo. La **Tabla 3.12** muestra los ASVs que fueron seleccionados positivamente en los consorcios resistentes y que, por lo tanto, presentan potencial como indicadores de metales (*secuencias positivas*), y los ASVs seleccionados por estar presentes tanto en consorcios resistentes como en los no expuestos (*secuencias neutrales*). Se indica, también, la cantidad de secuencias idénticas encontradas en la base de datos y la cantidad de éstas que presentaba información relevante para los análisis posteriores (número de *hits* con información respecto al ambiente de obtención de la secuencia (*n. ambiente*) y número de *hits* con datos sobre la ubicación geográfica del aislamiento (*n. geografía*)).

– CAPÍTULO III –

Tabla 3.12 – ASVs seleccionados y cantidad de secuencias idénticas (hits) encontradas en la base de datos

Sitio	Secuencias	ASV	Taxonomía ASV	Número total hits	n. ambiente	n. geografía
AL	Positivas	1	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	15	13	9
		6	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	80	66	40
		10	<i>Tyzzereella</i> unclas.	9	6	3
		67	<i>Sulfobacillus</i> unclas.	0	0	0
		104	<i>Paenibacillus</i> unclas.	0	0	0
		128	<i>Paenibacillaceae</i> unclas.	0	0	0
	Neutrales	2	<i>Lysinibacillus</i> unclas.	498	336	298
		3	<i>Ferroplasma</i> unclas.	0	0	0
		5	<i>Bacillus</i> unclas.	497	239	186
		20	<i>Pantoea</i> unclas.	498	381	305
SA	Positivas	7	<i>Alicyclobacillus</i> unclas.	4	4	4
		12	<i>Cellulomonas</i> unclas.	10	10	4
		13	<i>Cellulomonas</i> unclas.	8	7	5
		16	<i>Clostridium_sensu_stricto_13</i> unclas.	46	38	21
		36	<i>Clostridium_sensu_stricto_10</i> unclas.	10	9	6
		95	<i>Desulforhopalus</i> unclas.	2	2	2
	Neutrales	2	<i>Lysinibacillus</i> unclas.	498	336	298
4		<i>Acidiphilium</i> unclas.	106	76	57	
5		<i>Bacillus</i> unclas.	497	239	186	
8		<i>Sulfobacillus</i> unclas.	1	1	1	
9		<i>Bacillus</i> unclas.	499	286	245	
10		<i>Tyzzereella</i> unclas.	9	6	3	
11		<i>Alicyclobacillus</i> unclas.	0	0	0	
15		<i>Bacillales</i> unclas.	227	191	141	
17		<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> unclas.	143	101	73	
18		<i>Desulfovibrio</i> unclas.	0	0	0	
19		<i>Clostridium_sensu_stricto_14_lundense</i>	0	0	0	
21	<i>Thiomonas</i> unclas.	0	0	0		
25	<i>Planococcaceae</i> unclas.	0	0	0		
30	<i>Desulfovibrio aerotolerans</i>	0	0	0		
31	<i>Lysinibacillus</i> unclas.	498	331	292		

Se observó que las *secuencias neutrales* han sido reportadas considerablemente más veces que las *secuencias positivas* a la presión metálica. Por otro lado, muchas de las secuencias seleccionadas no han sido reportadas hasta el momento en la base de datos de NCBI, sugiriendo la presencia de microorganismos no cultivables o propios de esta región particular. Estos resultados sugieren, en primera instancia, que los ASVs presentes en todos los consorcios son también frecuentemente encontrados y reportados, mientras que los microorganismos seleccionados por la presencia de metales son mucho menos recurrentes a nivel global. En forma indistinta, muchos microorganismos serían más bien autóctonos de este sitio de muestreo en particular.

Respecto a la taxonomía de los *hits*, en la vasta mayoría de los casos, los microorganismos aislados pertenecían al mismo género que se le asignó al correspondiente ASV durante el procesamiento de las secuencias realizado en este trabajo utilizando la base de datos de Silva (**Sección 3.2.4**). En particular, el ASV 4, ASV 27 y ASV 42¹⁰ fueron similares a secuencias de microorganismos reportados por este mismo grupo en trabajos previos en la misma región de Caviahue-Copahue. El ASV 4 fue similar a tres aislados de *Acidiphilium* provenientes de Salto del Agrio (número de acceso KY630623, KY630622 y KY630619); el ASV 27 presentó identidad con otros tres aislados de *Acidithiobacillus*, también obtenidos de muestras de Salto del Agrio (KY630612, KY630609 y KY630607); mientras que el ASV 42 fue idéntico a dos aislados de *Sulfobacillus* provenientes de *hotsprings* de la región (MN453467 y MK450152).

Las secuencias se agruparon de acuerdo con las características del ambiente en el que se encontraron; para ello los ambientes de los aislados se clasificaron en diez categorías: acuático, suelo, geotermal, minero, agrícola, impactado, endófito, microbiota, bioproceso y otros.

¹⁰ Los ASV 27 y 42 corresponden a secuencias con selección negativa, es decir, que estaban presentes en los consorcios no expuestos y se perdieron en los consorcios resistentes. Las *secuencias negativas* fueron incluidas en el análisis de BLAST pero no fueron evaluadas más allá, ya que el estudio se centró en la búsqueda de indicadores de metales (con selección positiva) que pudieran presentar un potencial global.

La **Figura 3.13 A** muestra un diagrama de cuerdas indicando el tipo de ambiente donde se encontraron secuencias (microorganismos) neutrales de Agua de Limón. En la **Figura 3.13 B** se representan los ambientes donde se localizaron secuencias idénticas a las secuencias positivas. En los diagramas se representan, abajo y a color, los ASVs con la cantidad de *hits* representados (dado que no todos los reportes contienen los metadatos completos, el número de secuencias representado en este análisis no es idéntico al total encontrado. Ver **Tabla 3.12** columna *n.* ambiente). Las *cuerdas*, de ancho proporcional al número de secuencias que representa, se corresponden con las categorías de donde fueron aislados esos microorganismos (las categorías están en gris en la medialuna superior). Como ejemplo, vemos en la **Fig. 3.13 B**, que se encontraron 66 secuencias idénticas al ASV 6 en la base de datos; de esas 66 secuencias aproximadamente un tercio se reportó aislado de ambientes geotermales, otro tercio de bioprocesos (biorreactores, columnas y pilas de biolixiviación), poco menos de un tercio de ambientes mineros y una secuencia fue reportada desde un ambiente impactado.

Se observa que las secuencias neutrales (**Fig. 3.13 A**) fueron reportadas con mucha frecuencia en todas las categorías de ambientes aquí utilizadas, lo que sugiere, principalmente, versatilidad y adaptabilidad. Por otro lado, las secuencias definidas positivas en este trabajo también fueron reportadas en varios ambientes (aunque, como se mencionó, en mucha menor cantidad), pero incluso fueron reportadas en ambientes – en principio – prístinos, como son las categorías acuático y suelo (tal cual ocurre en los casos de los ASV 1 y 10). El ASV 6 sólo fue reportado en ambientes extremos, expuestos o afectados: geotermal, minero, impactado y bioprocesos (**Fig. 3.13 B**).

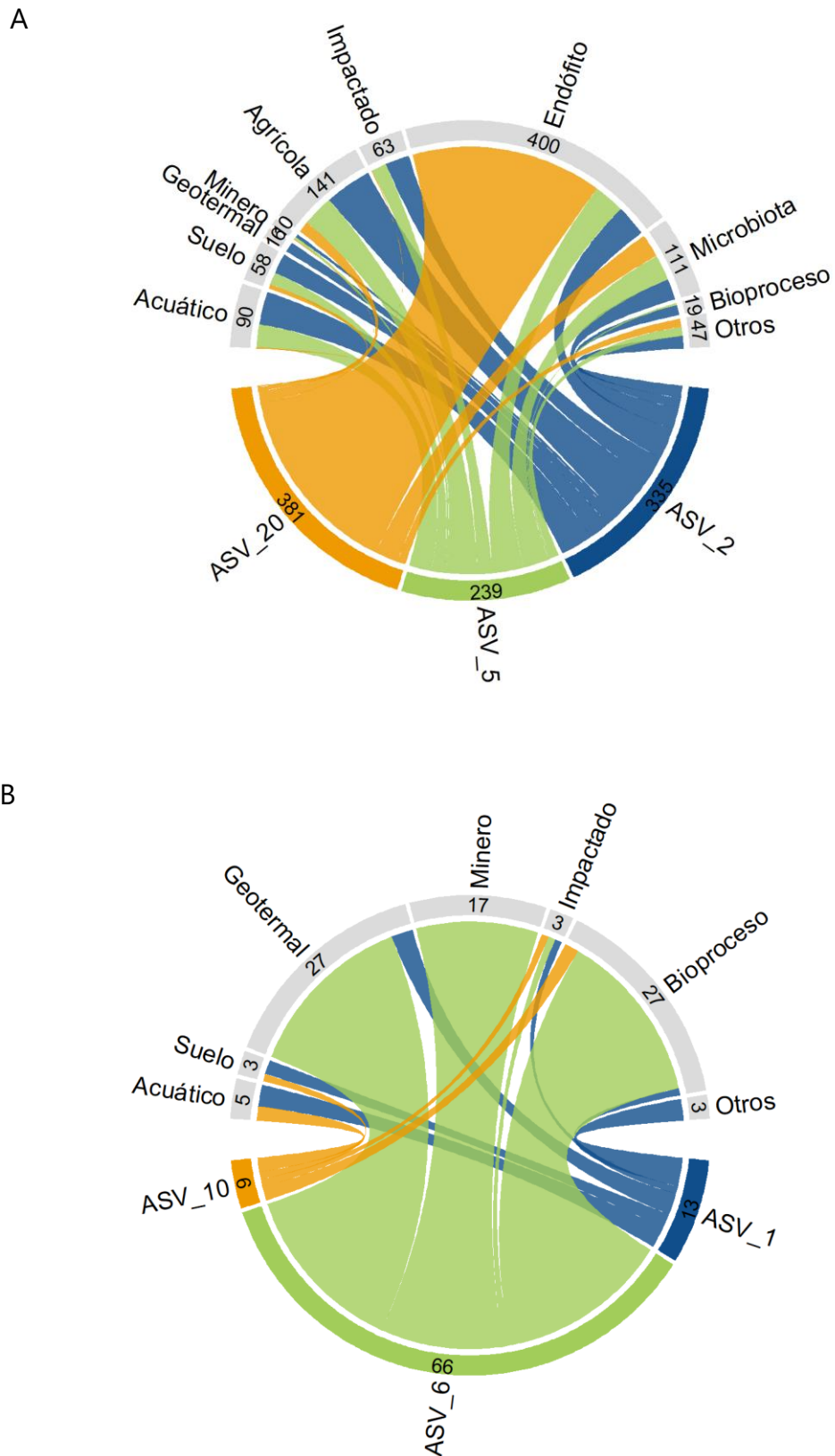
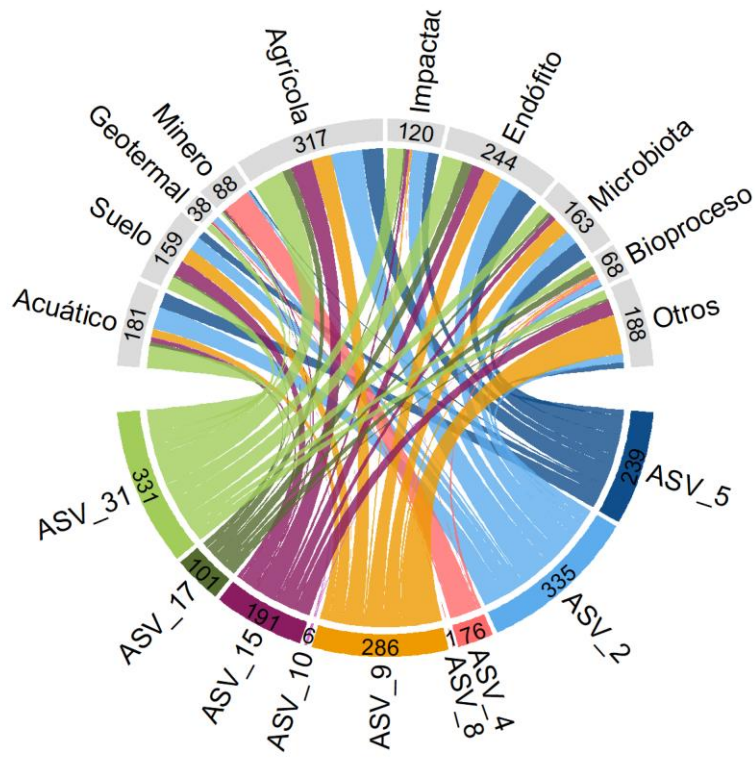


Figura 3.13 – Diagrama de cuerdas del tipo de ambiente en donde fueron aislados los hits de los ASVs seleccionados por estar en todos los consorcios de AL (A) y por su prevalencia en los consorcios resistentes de esa muestra (B).

Respecto a las secuencias de consorcios provenientes de Salto del Agrio (**Figura 3.14**), se observó que, también en este caso, los ASVs presentes en todos los consorcios se correspondían con microorganismos reportados frecuentemente en ambientes diversos (como en el caso de AL, este resultado sugiere versatilidad y adaptabilidad). Del mismo modo, los ASVs que se vieron seleccionados en los consorcios resistentes fueron idénticos a secuencias reportadas más raramente, aunque también en ambientes diversos (prístinos y expuestos). Por ejemplo, el ASV 16, que en este trabajo se vio fuertemente seleccionado tras la exposición a níquel, tiene secuencias idénticas en la base de datos de NCBI correspondientes a microorganismos aislados en todas las categorías de ambientes aquí clasificadas. Por el contrario, los *hits* del ASV 95 sólo fueron aislados de ambientes acuáticos. El caso probablemente más interesante corresponde al ASV 7, que coincide con microorganismos aislados únicamente de ambientes mineros (en general, ácidos y con presencia de elevadas concentraciones de metales).

A



B

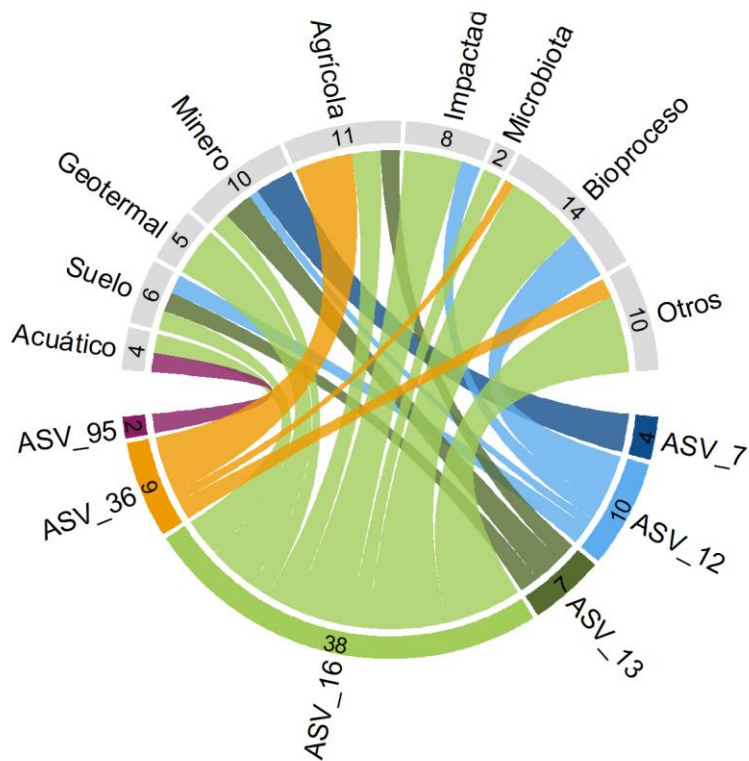


Figura 3.14 – Diagrama de cuerdas del tipo de ambiente en donde fueron aislados los hits de los ASVs seleccionados por estar en todos los consorcios de SA (A) y por su prevalencia en los consorcios resistentes de esa muestra (B).

Posteriormente, se analizó la ubicación geográfica de los reportes de las secuencias idénticas encontradas. Para ello se construyeron mapas en donde se ubicaron los *hits* para cada ASV; tal como se mencionó en el análisis anterior, no todas las secuencias reportadas en la base de datos contienen metadatos completos (en este caso la información geográfica del aislado), por lo que el número utilizado aquí difiere del total y del análisis anterior (**Tabla 3.12** columna *n.geografía*).

La **Figura 3.15** muestra la ubicación de los aislados idénticos a las secuencias neutrales de Agua de Limón y la localización de los microorganismos similares a las secuencias positivas en los consorcios resistentes.

En concordancia con lo que se observó en los análisis anteriores, los aislados similares a los ASVs presentes en todos los consorcios (secuencias neutrales) han sido reportados en prácticamente todas las regiones del mundo. Por su parte, los microorganismos relacionados a los ASVs con selección positiva en los consorcios resistentes se encontraron menos reportados, pero no restringidos a una región particular; no obstante, no existen reportes (explicitados en la base de datos) para el ASV 1 y el ASV 10 en el continente americano. Los microorganismos relacionados al ASV 6, aún a pesar del bajo número de reportes, han sido encontrados en regiones variadas del mundo.

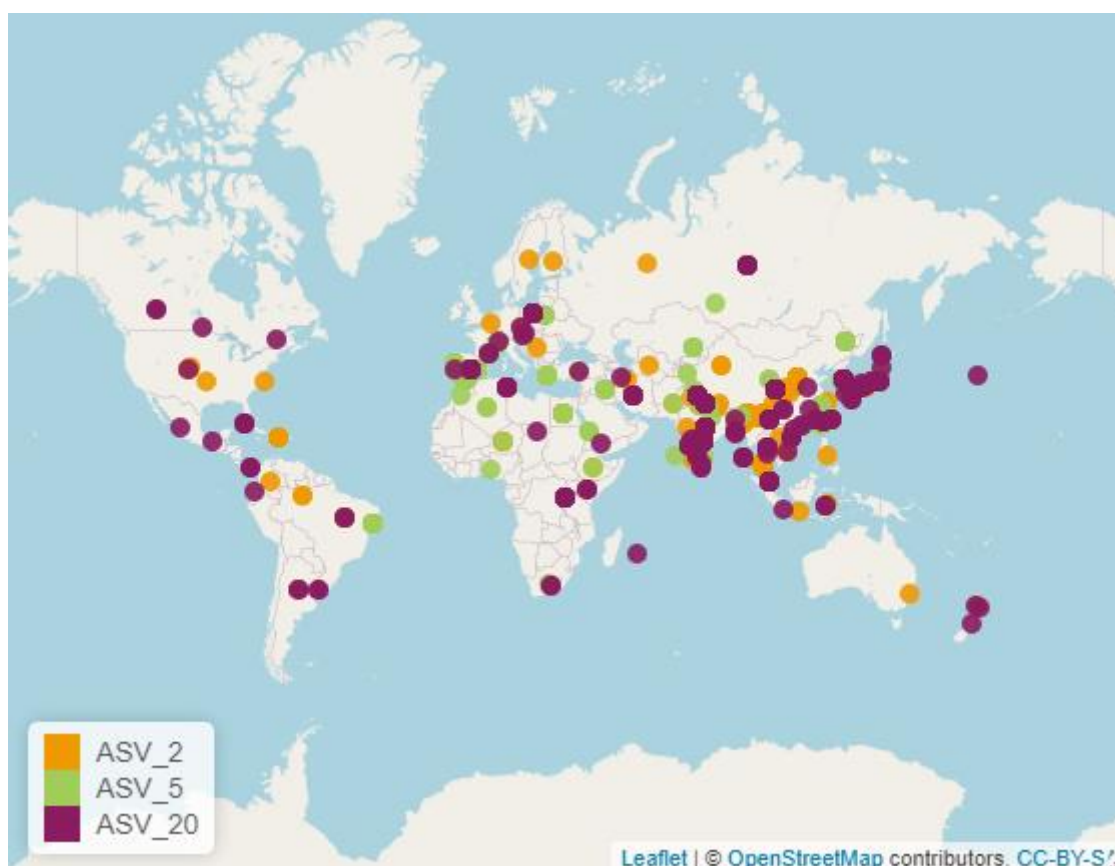


Figura 3.15 – Ubicación geográfica de los hits de los ASVs seleccionados en los consorcios de AL. Arriba los presentes en todos los consorcios y abajo aquellos prevalentes en consorcios resistentes.

En Salto del Agrio (**Figura 3.16**) se observó un comportamiento similar para las secuencias de los ASVs presentes en todos los consorcios, habiendo sido frecuentemente reportadas en prácticamente todo el mundo. Por el contrario, algunas secuencias positivas han sido reportadas en regiones particulares. Por ejemplo, el ASV 95 fue encontrado en el continente Antártico y en el Polo Norte; el ASV 12 se corresponde con secuencias reportadas en países nórdicos; el ASV 7 sólo ha sido reportado en China y el ASV 36 en China y Japón. El único ASV con secuencias idénticas reportadas a nivel global fue el ASV 16. Sorprendentemente no existen reportes de ninguna de todas estas secuencias en el continente americano.

Estos resultados sugieren la ubicuidad de los microorganismos que se encontraron en todos los consorcios de este estudio, sumado a una alta adaptabilidad y versatilidad. Por otro lado, los microorganismos correspondientes a los ASVs seleccionados frente a la presencia de metales, mostraron una ocurrencia global dispar: mientras que algunos se vieron acotados a regiones particulares, otros se encontraron dispersos y ubicuos.

De todos los ASVs estudiados por su potencial indicador, ASV 6, clasificado como *Acidithiobacillus Caldus* y cuyos *hits* corresponden todos al mismo género, parece el más promisorio para su consideración a nivel mundial. Este ASV presentó aislados únicamente en ambientes extremos o afectados y fue reportado globalmente. El ASV 7, clasificado como *Alicyclobacillus*, sólo fue aislado de ambientes mineros, pero únicamente ha sido reportado en China, lo cual dificulta la extrapolación de su potencial como indicador de uso global.

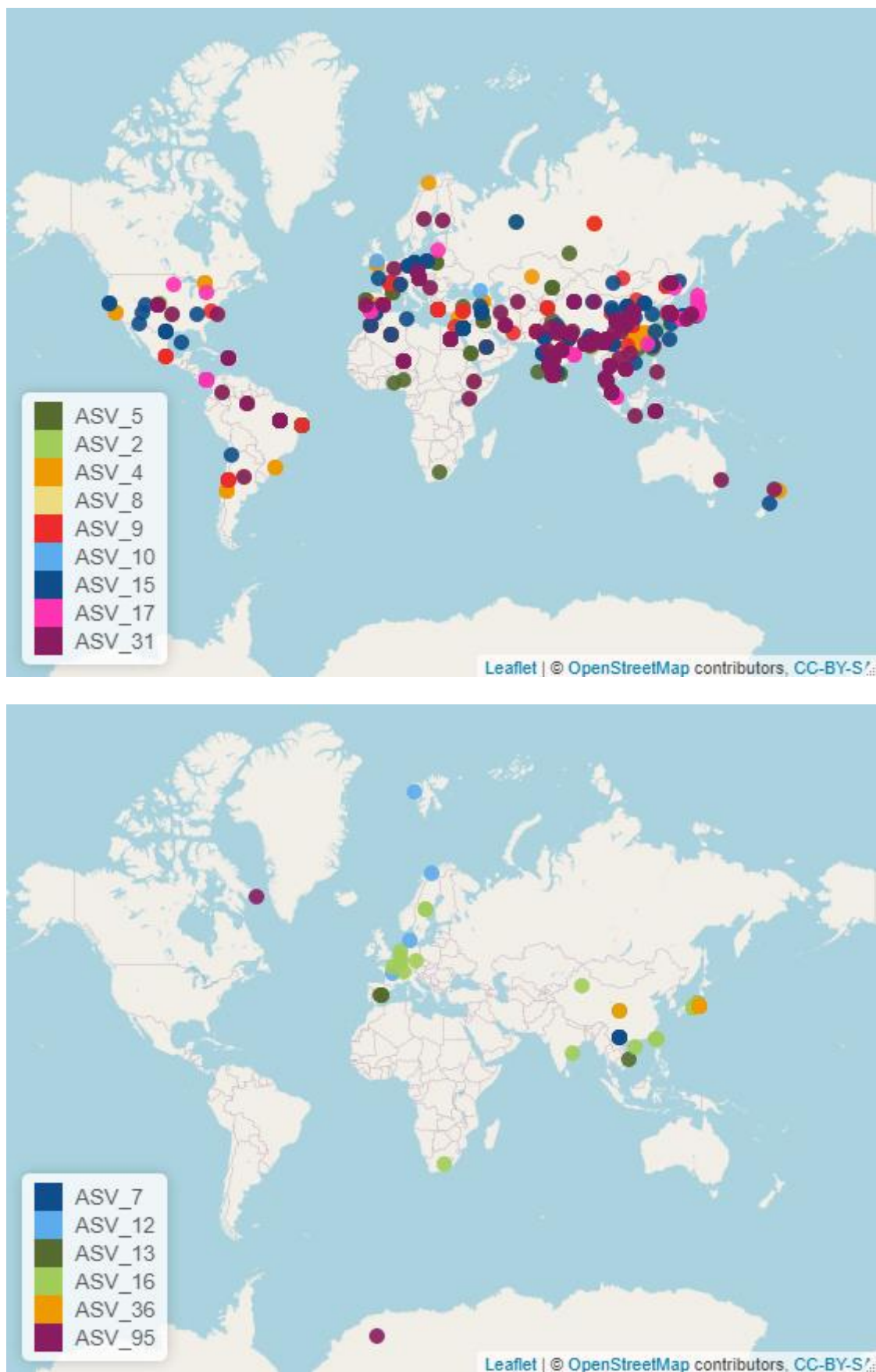


Figura 3.16 – Ubicación geográfica de los hits de los ASVs seleccionados en los consorcios de SA. Arriba los presentes en todos los consorcios y abajo aquellos prevalentes en consorcios resistentes.

3.4. DISCUSIÓN

En el **Capítulo 2**, a partir de la comparación entre las concentraciones iniciales y remanentes de los metales agregados a los cultivos, pudieron obtenerse algunas precisiones sobre las estrategias usadas por los consorcios obtenidos para tolerar altas concentraciones metálicas. De modo general, los consorcios anaeróbicos disminuyeron drásticamente la concentración de metales en solución a causa de la generación de sulfuros, lo que provocó la formación de precipitados estables. En algunos consorcios aeróbicos organótrofos, la disminución en la concentración de los metales y un cambio significativo en la viscosidad del medio sugirieron la producción de material polimérico que sorbió y complejó los metales que quedaron, posiblemente, asociados a la superficie celular. Por último, la altísima tolerancia de los consorcios con metabolismo litótrofo acidófilico, sin cambios significativos en la concentración de los metales, sólo podría ser explicado a través de procesos de exclusión molecular (dentro de los mecanismos conocidos), lo que requiere la presencia de bombas de eflujo. Para convalidar esta hipótesis, en este capítulo se evaluó la presencia de nueve genes de resistencia vinculados con transportadores de eflujo específicos para los metales utilizados.

La resistencia a cadmio puede estar dada por dos mecanismos de eflujo descriptos: el sistema *cad* y el sistema *czc*. El sistema *cad*, encontrado en el plásmido pI258 e inicialmente estudiado en *Staphylococcus aureus* (Smith & Novick, 1972), codifica para una ATPasa de tipo P para cationes divalentes, *cadA*, la cual transloca Cd(II) desde el citoplasma hacia el exterior de la membrana hidrolizando ATP. Homólogos de *cadA* han sido encontrados en una diversidad de organismos y, en algunos casos, se ha observado que estos sistemas conferían también resistencia a Zn(II), Pb(II) o Pd(II) (Rensing *et al.*, 1998). En este trabajo, los consorcios organótrofos de Salto del Agrio, tanto en el consorcio resistente (SAoCd) como en el no expuesto (SAoSM), amplificaron positivamente para el gen *cadA*. SAoCd estuvo dominado por el género *Bacillus* (ASV 5), lo cual es concordante con los reportes de *cadA* en este género (Ivey *et al.*, 1992; Solovieva

& Entian, 2002); mientras que el consorcio SAoSM estuvo compuesto en una proporción importante por los géneros *Lysinibacillus* (ASV 2) y *Pseudogracilibacillus* (ASV 14), ambos muy cercanos filogenéticamente a *Bacillus* y de la misma familia Bacillaceae. Ninguno de los consorcios litótrofos acidófilos de este trabajo mostró amplificación positiva utilizando estos *primers* específicos. Dopson *et al.* (2003) reportaron un sistema de alta homología con *cadA* sólo en el genoma de los acidófilos *A. ferrooxidans* y *Thermoplasma* spp., aunque estos resultados – como mencionan los autores – no son concluyentes.

El otro sistema que puede conferir resistencia a cadmio es *czc*, reportado para *Cupriavidus metallidurans* (previamente denominado *Alcaligenes eutrophus* y *Ralstonia metallidurans*) (Nies, 1992; Williams & Coleman, 1992). Este sistema, encontrado en los plásmidos pMOL28 y pMOL30, codifica para un transportador del tipo CBA capaz de bombear Cd(II), Co(II) y Zn(II) desde el citoplasma hacia el exterior de la célula ingresando protones desde el periplasma. El operón consiste en varios genes de los cuales tres (*czcA*, *czcB* y *czcC*) codifican para las proteínas que conforman el transportador transmembrana CBA. La proteína principal del operón, *czcA*, es un antiporter de cationes y protones ubicado en la membrana interna (Goldberg *et al.*, 1999), *czcC* se ubica en la membrana externa y expulsa el catión hacia el exterior (OMF, *outer membrane factor*) y *czcB* es la proteína de fusión (MFP, *membrane fusion protein*) que conecta *czcA* y *czcC* para formar un único canal desde el citoplasma hacia el exterior (Nies, 2003). Otro gen del mismo operón, pero independiente del transportador CBA, es *czcD* que codifica para un facilitador de difusión (CDF, *cation diffusion facilitator*) (Haney *et al.*, 2005). Debido a su estructura, el complejo *czcCBA* sólo es funcional en bacterias Gram-negativas, mientras que las Gram-positivas pueden utilizar el sistema de una sola unidad (*czcA* o *czcD*) para exportar los cationes (Nies, 2003).

La mayoría de los consorcios obtenidos durante este trabajo de tesis, amplificaron en la región correspondiente al sistema *czcA*; de los 20 consorcios evaluados (incluye los no expuestos y los resistentes a cadmio, zinc y cobalto que podrían justificar su resistencia a través de aquel sistema), sólo dos (SAnZn y SAnCd) no amplificaron o amplificaron fragmentos de longitud inesperada.

Estos dos consorcios corresponden a metabolismos anaeróbicos que, como se ha dicho, responden a otra estrategia de resistencia (inmovilización de los metales por precipitación), por lo que no resulta extraña la ausencia del sistema *czc*. La única excepción a este comportamiento de los consorcios anaeróbicos fue el consorcio SAnCo que mostró amplificación positiva para *czcA*; la elevada concentración en la que se desarrolló este consorcio (~600 mg/L) justificaría la existencia de un mecanismo adicional de resistencia, más allá de la capacidad de precipitar al metal bajo la forma de sulfuro.

Los consorcios acidófilos de este trabajo de tesis estuvieron dominados por géneros de especies Gram-negativas: *Acidiphilium* (en los consorcios SA) y *Acidithiobacillus* (en los consorcios de AL); todos estos consorcios mostraron amplificación positiva para el gen *czcA*. Esto es consistente con el reporte de Mangold *et al.* (2013) sobre la presencia del operón *czcCBA* en *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrivorans* y *Leptospirillum* spp. En cambio, ese mismo trabajo reporta que no hubo amplificación positiva para las arqueas *Ferroplasma acidarmanus* y *Thermoplasma acidophilum* y tampoco para microorganismos Gram-positivos como *Acidimicrobium ferrooxidans*. No obstante, los consorcios aeróbicos organótrofos de este estudio, a pesar de estar dominados por taxones asignados a la familia Bacillaceae (que son bacterias Gram-positivas), dieron amplificadas positivas. Es probable que estos consorcios dispongan solo del gen *czcA* (y quizás del *czcD*) pero no del operón completo (ya que no es posible para Gram-positivos), considerando que *czcA* por sí sola puede conferir resistencia sin la necesidad del complejo *czcCBA* (Rensing *et al.*, 1997).

A diferencia de los otros metales estudiados en este trabajo de tesis doctoral, el cobre interviene en reacciones de oxido-reducción en la célula; usualmente, este metal existe como Cu(II) libre en solución y como Cu(I) intracelularmente, aunque este último nunca se encuentra libre dentro de la célula dado su poder reductor (Rae *et al.*, 1999). Por esta razón, existe una variedad de sistemas que permiten mantener la homeostasis de este metal en la célula; entre ellos se destacan tres operones cromosómicos, *cop*, *cus* y *cue*, y uno plasmídico, *pco*.

El operón *cop* codifica para una ATPasa de tipo P (*copA*), al igual que el operón *cad*, pero de cationes univalentes. La función de *copA* difiere en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Silver & Phung, 2005). En *E. Coli* (Gram-negativa), la proteína *copA* expulsa Cu(I) del citoplasma al periplasma (Rensing *et al.*, 2000; Rensing & Grass, 2003) mientras que en la bacteria Gram-positiva, *Enterococcus hirae*, *copA* ingresa Cu(I) al citoplasma y es otra ATPasa tipo P, *copB*, la que lo expulsa (Silver & Phung, 1996).

En las bacterias Gram-negativas, el Cu(I) expulsado al periplasma no puede permanecer libre por el riesgo de oxidación de los componentes celulares de la membrana; debido a ello, estos microorganismos suelen contar con sistemas adicionales como *cue*, *cus* y *pco*. CueO es una oxidasa que se encuentra en el periplasma y es capaz de transformar Cu(I) en Cu(II) en presencia de oxígeno generando agua (Singh *et al.*, 2004). La misma función cumple la enzima *pcoA* del sistema *pco*, con la diferencia de que este sistema está codificado en plásmidos (Besaury *et al.*, 2016). El sistema *cus*, descrito en *E. coli*, es un sistema de transporte independiente que también puede expulsar Cu(I) desde el periplasma (Franke *et al.*, 2003). Se trata de un transportador del tipo CBA similar al sistema *czc* mencionado previamente. Este sistema está codificado por el operón *cusCFBA*, donde *cusA* es la proteína antiporter, *cusB* una MFP y *cusC* un OMF. A diferencia de *czc*, este sistema cuenta con un gen adicional, *cusF*, que codifica para una proteína del periplasma que se une a cobre y facilita la expulsión de Cu(I) libre en ese espacio.

En este trabajo, los cuatro consorcios organótrofos evaluados (los dos no expuestos a cobre, SAoSM y ALoSM, y los dos resistentes, SAoCu y ALoCu) tuvieron amplificaciones positivas para el gen *copA*. Este resultado concuerda con la amplia distribución reportada para el sistema *cop* en una gran diversidad de microorganismos: bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, cianobacterias y arqueas (Mandal *et al.*, 2002; Nies, 2003). La presencia de este gen y la ausencia de los sistemas periplasmáticos *cus* y *pco* en estos consorcios se condice con su composición taxonómica, con dominancia de géneros Gram-positivos (*Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Bacillus*). La presencia de *pcoA* en SAoSM podría ser

llamativa por esta misma razón, aunque se determinaron taxones en mediana abundancia correspondientes a géneros Gram-negativos (*Mesorhizobium* y *Tissierella*) que podrían justificar esa amplificación.

En acidófilos, Navarro *et al.* (2009 y 2013) reportaron la presencia de genes del sistema *cop* y *cus* en los genomas de *A. ferrooxidans* y de *A. caldus*; en este último también identificaron la presencia de *cueO*. A pesar de ello, los consorcios acidófilos de este trabajo de tesis, tanto los dos no expuestos como el resistente proveniente de SA (SAaSM, ALaSM y SAaCu), sólo mostraron amplificación positiva para *pcoA* (no se detectó presencia de *copA* ni de *cusA*). En estos casos, algunos taxones presentes o dominantes correspondían a géneros Gram-negativos (*Acidiphilium* y *Acidithiobacillus*) o Gram-variables (*Alicyclobacillus*). El consorcio ALaSM mostró amplificación positiva para *pcoA*; sin embargo, ALaCu – el consorcio resistente obtenido a partir de aquel consorcio no expuesto – no amplificó. Una posible explicación a este hecho es que la arquea *Ferroplasma* fue el único taxón importante de ALaCu mientras que ALaSM presentaba también al género *Acidithiobacillus* que justificaría la amplificación. Villafañe *et al.* (2009 y 2011) reportaron la identificación de locus similares al sistema *cop* en las arqueas acidófilas *Ferroplasma acidarmanus*, *Thermoplasma acidophilum* y *Sulfolobus solfataricus*; no obstante, es muy posible que la baja homología entre los dominios ocasionara que los *primers* y las condiciones de amplificación utilizadas en este trabajo no fueran las adecuadas para su detección en arqueas.

Por último, ninguno de los dos consorcios anaeróbicos evaluados (SAnSM y SAnCu) mostró amplificación de los genes de resistencia testeados.

Similar al caso del cobre, el zinc cumple un rol preponderante en la funcionalidad de la célula por lo que su homeostasis debe estar estrictamente regulada. Además del sistema *czc* descrito previamente, existe una variedad de transportadores para el ingreso (*znuABC*, *mntH*, *zupT*, *corA*, todos en *E. coli*) y la expulsión del catión (*ziaA* y *zntCBA* en cianobacteria; *zntA* y *cadA* en *S. aureus*; *zntA* y *zitB* en *E. coli*) (Silver & Phung, 2005). En este trabajo, se evaluaron los dos transportadores de eflujo de *E. coli*: *zntA* y *zitB*. El primero, codificado por el gen

zntA, es una ATPasa de tipo P para cationes divalentes de la misma familia que *cadA*. Ambos transportadores son muy cercanos evolutivamente y, en algunos casos, pueden intercambiar sustratos (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) (Nies, 2003). Por otro lado, *zitB* es un facilitador de difusión (CDF) que utiliza el gradiente de protones o de sodio para exportar Zn^{2+} desde el citoplasma (Lee *et al.*, 2002).

Los microorganismos acidófilos, en general, presentan elevadas resistencias a este metal. Mangold *et al.* (2013) reportaron la presencia de *zntA* y *zitB* en los genomas de *A. ferrooxidans*, *A. caldus*, *A. ferrivorans*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Leptospirillum* spp. y *Ferroplasma acidarmanus*, mientras que el genoma de *Thermoplasma acidophilum* sólo presentó *zntA*. Ninguno de los consorcios de este trabajo, tanto los resistentes a zinc como los no expuestos, tuvieron amplificaciones positivas para los genes *zntA* y *zitB* en las condiciones probadas. La presencia de *czcA* podría explicar la resistencia a zinc exhibida, aunque la presencia de los microorganismos estudiados por Mangold *et al.* en estos consorcios y la dispersión – particularmente – de *zntA* en neutrófilos, hace suponer que las condiciones de amplificación o los *primers* utilizados no fueron los adecuados. Es por eso que, considerando que en este trabajo no se realizaron controles positivos para los genes ensayados, la presencia de estos mecanismos no puede descartarse definitivamente.

La resistencia a níquel y cobalto puede estar dada por dos sistemas codificados en plásmidos de multi-resistencia de *C. metallidurans* (Mergeay *et al.*, 2009): *ncc* en el plásmido pMOL30 (Schmidt & Schlegel, 1994) y *cnr* en pMOL28 (Sensfuss & Schlegel, 1988; Liesegang *et al.*, 1993). Ambos son transportadores del tipo CBA similares a *czc*; más aún, las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *cnr* son tan cercanas a las de *czc* que pequeñas mutaciones en la primera pueden conferir también resistencia a Zn(II) (Silver & Phung, 2005). Estos sistemas, en general, han sido reportados en poblaciones microbianas presentes en ambientes altamente contaminados (Abou-Shanab *et al.*, 2007; Mirete *et al.*, 2007); no obstante, su presencia en plásmidos permitiría su transferencia horizontal y dispersión. En este trabajo de tesis, no se obtuvo amplificación positiva para el gen que codifica para la proteína RND del sistema *nccCBA*, *nccA*,

ni para un determinante del operón *cnr*, en ninguno de los consorcios resistentes a Ni(II) y Co(II) ni en los consorcios no expuestos. Estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos de resistencia no conocidos ni evaluados, pero no puede descartarse de manera definitiva que las condiciones de amplificación y los primers utilizados hayan sido inadecuados.

En este capítulo, se estudió la composición microbiana de los consorcios a partir de la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S ARNr. El procesamiento de estos datos se ha hecho históricamente a través de la conformación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs). El procedimiento por OTUs puede realizarse construyendo *clústeres* (que luego serán los OTUs, ver **Materiales y métodos 3.2.4**) utilizando una base de datos de referencia (*closed-reference*) o *de-novo*. En el primer caso, las secuencias se alinean con la base de datos en función de su porcentaje de similitud (usualmente se utiliza 97% como valor de corte); en el segundo caso, las secuencias forman *clústeres* entre sí (entre todas las secuencias de ese *dataset*) a partir de la similitud. Los OTUs *de-novo*, por lo tanto, están condicionados y limitados por el *dataset* usado para formarlos; debido a ello, un OTU obtenido en un análisis de este tipo no puede ser extrapolable ni comparable con el obtenido en otro análisis independiente. Por otro lado, los OTUs *closed-reference* están condicionados a las secuencias presentes en la base de datos particular; estos OTUs pueden compararse con los obtenidos en otros análisis en que se haya utilizado la misma base de datos, estando ambos condicionados por la base de datos utilizadas y limitados a las secuencias allí reportadas. En ambos casos, el procesamiento por OTUs genera secuencias consenso que no reflejan las secuencias *reales* de los datos, sino una suerte de *promedio* de las secuencias en cada *clúster*/OTU. Como consecuencia, los OTUs no reflejan una realidad taxonómica (Callahan *et al.*, 2017).

Recientemente, se han desarrollado nuevas metodologías con mayor resolución y aplicabilidad y enfocadas en resolver la problemática provocada por los OTUs; entre estas metodologías, se destaca la de las variantes de secuencias de amplicón (ASVs) que se propone como procedimiento estándar para reemplazar a los OTUs (Callahan *et al.*, 2017). Los ASVs se infieren *de-novo* en

cada muestra de forma independiente considerando la tasa de error (ver **Materiales y métodos 3.2.4**); de este modo, se obtienen secuencias exactas y *reales* y, por lo tanto, extrapolables a otros análisis. Estas dos características son suficientes para hacer que el análisis por ASVs sea preferible al de OTUs. No obstante, persisten algunas dificultades como, por ejemplo, la existencia de microorganismos con varias copias del gen 16S ARNr que incluso, en algunos casos, pueden ser diferentes entre sí (Sun *et al.*, 2013); esto implica la sobreestimación de esos taxones particulares. Es importante mencionar que los ASVs pueden aplicarse a cualquier gen y *loci*, aunque en esta discusión se hace mención sólo a 16S ARNr porque es de directa relación con lo realizada en este trabajo de tesis. Una dificultad adicional del análisis a través de variantes de secuencias de amplicón es que la extrapolación de un ASV hacia otro análisis independiente sólo puede hacerse si en ambos análisis se amplificó la misma región hipervariable del gen (preferentemente utilizando los mismos *primers*); si no fuera así, las secuencias no serían alineables y los ASVs no podrían agregarse. Debido a esta dificultad, un meta-análisis sólo puede realizarse si se utiliza la taxonomía asignada de los ASVs (en conocimiento de su carácter *verdadero*) y no las secuencias, por lo que resulta un análisis de filotipos (ver **Materiales y métodos 3.2.4**) que estará en dependencia y limitado a la base de datos utilizada para asignar la taxonomía de esos ASVs.

En este trabajo de tesis se utilizaron los tres procedimientos: OTUs, ASVs y filotipos derivados del análisis de ASVs. Una diferencia entre ellos fue la cantidad obtenida: 749 ASVs totales y 4217 OTUs; esto indica que, de acuerdo con el análisis de ASVs, la cantidad de especies presentes en las muestras fue un quinto de la cantidad que sugieren los OTUs. No obstante, y a pesar de ello, los resultados obtenidos en los análisis posteriores y las conclusiones alcanzadas son similares, lo cual es apreciable, por ejemplo, en la similitud de los gráficos de escalado dimensional (NMDS) y en los análisis de diversidad alfa. Esta observación sugiere que las conclusiones encontradas en este trabajo de tesis son lo suficientemente robustas como para imponerse independientemente de la variabilidad y las deficiencias de la metodología usada.

En los estudios de diversidad con datos de secuenciación masiva, las abundancias de los taxones suelen ser normalizadas previo a los análisis, usualmente transformándolas en abundancias relativas; sin embargo, McMurdie & Holmes (2014) han mostrado que este procedimiento no es recomendable y debería evitarse. Como alternativa, Weiss *et al.* (2017) proponen evaluar la significancia del tamaño de la muestra en función de la hipótesis antes de su evaluación, o, incluso más adecuado, añadir esa información como una variable más dentro del modelo. En este trabajo de tesis, se optó por esta última solución por lo que se trabajó con las abundancias crudas de los taxones en las muestras. No obstante, es importante destacar que el coeficiente de Bray-Curtis calculado ya tiene en cuenta el tamaño de la muestra, debido a que la sumatoria de las diferencias entre las abundancias de taxones de dos muestras es dividida por la sumatoria de la abundancia de todos los taxones de esas muestras (Oksanen *et al.*, 2020) (ver **ecuación 3.1**). De todos modos, el efecto del tamaño de la muestra sólo tuvo una influencia menor al 6% en los resultados de los análisis.

El primer análisis de los perfiles microbianos sugirió que las comunidades eran mucho más disimiles a los cultivos que estos entre sí; esta conclusión se corresponde con el llamado *sesgo por cultivo* (*culturing-bias*) que es conocido en todas las áreas de la microbiología (Del Campo *et al.*, 2013, 2014; Handelsman, 2004; Snyder *et al.*, 2004). En el análisis de diversidad alfa, se encontró que la comunidad de Salto del Agrio era considerablemente más diversa (tanto en riqueza como en equidad) que los consorcios obtenidos a partir de ella, sugiriendo que las condiciones del cultivo seleccionaron a algunos microorganismos mientras que otros, susceptibles a las condiciones impuestas, se perdieron, lo que resultó en una disminución de la diversidad. En cambio, los consorcios y la comunidad de Agua de Limón mostraron diversidades similares; en este caso, las condiciones del cultivo provocaron una selección de microorganismos –o un moldeado de la comunidad– sin una pérdida significativa de especies y, consecuentemente, sin una disminución evidente de diversidad.

Esta diferencia puede relacionarse con la naturaleza de los sitios muestreados, en el caso de SA, las condiciones del río, con el aporte constante de diversos tributarios, ofrecen riqueza y diversidad en las fuentes de nutrientes y energía disponibles, generando un sistema complejo con una gran cantidad de nichos ecológicos. Esto permite el desarrollo de una comunidad microbiana diversa que, al ser expuesta a las delimitadas condiciones de cultivo, indefectiblemente pierde especies como consecuencia de la desaparición de ciertos nichos. Por el contrario, las condiciones del *hotspring* de AL, más extremas y con menor cantidad de nichos ecológicos, deben haber seleccionado naturalmente a los microorganismos multirresistentes y flexibles, fomentando la *sociabilización* de los genes.

Existen numerosos reportes, y es ampliamente aceptado que los ambientes *hostiles* presentan una diversidad microbiana significativamente disminuida (Bell *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2014; Abdu *et al.*, 2017; Jacquiod *et al.*, 2018). Esos reportes suelen referirse a ambientes perturbados y contaminados intensivamente en un tiempo prolongado, estableciendo así una comunidad especializada la cual se compara con un sitio cercano *similar*. No obstante, muy rara vez se evalúa cómo responden estas comunidades (la especializada y la que se considera *control*) a nuevas perturbaciones. En ese sentido, no existe una relación demostrada que permita predecir el comportamiento de una comunidad a partir de su diversidad: una comunidad de gran diversidad alfa no necesariamente tendrá un mejor desarrollo frente a una presión determinada en comparación con una comunidad de baja diversidad. De hecho, tampoco es posible establecer una guía sobre qué valores de índices corresponderían a una *diversidad alta* o *baja*, ya que se presupone que una comunidad establecida contiene todas las funciones necesarias para su subsistencia en ese ambiente particular bajo las condiciones existentes (de lo contrario ese ecosistema colapsaría). En ese sentido, al realizar un metaanálisis de datos metagenómicos de *hotsprings* alrededor del mundo, no se encontró una correlación entre los índices de diversidad alfa y la temperatura o el pH, es decir que, al tratar con comunidades establecidas, un ambiente más *hostil* no necesariamente implica una menor diversidad (Massello *et al.*, 2020). Por

esta razón, los índices de diversidad alfa no tienen un significado *per se*, sino que deben ser interpretados de manera comparativa a lo largo de un proceso y en función de hipótesis concretas relacionadas a un mismo ambiente (Nielsen *et al.*, 2011; Shade, 2017). En este trabajo de tesis, no se encontraron diferencias en la diversidad de los consorcios resistentes y los consorcios no expuestos a metales, y tampoco fue posible establecer una correlación entre la diversidad alfa y la resistencia exhibida por los consorcios. Esto puede deberse a que en la comunidad autóctona original ya habitaban una gran cantidad de microorganismos multirresistentes y versátiles, justificado por la naturaleza extremófila de la región.

La mayor similitud observada entre la composición microbiana de la comunidad AL original y los consorcios acidófilos puede relacionarse con el mencionado *culturing-bias* y la naturaleza de la muestra, ya que las condiciones dadas por el medio utilizado (bajo valor de pH, presencia de hierro y de azufre, y baja carga orgánica) se asemejan a las del ambiente muestreado, mientras que distan de las condiciones de cultivo del medio para organótrofos neutrófilo. Como se ha indicado en la sección de resultados, las diferencias (y similitudes) determinadas entre las composiciones microbianas de consorcios y comunidades pueden explicarse en gran medida (32%) por el metabolismo seleccionado (es decir, por las condiciones de cultivo), siendo los consorcios de un mismo metabolismo más similares entre sí que respecto a los consorcios con otro metabolismo, e independientemente de la exposición metálica. Este resultado destaca, nuevamente, el *culturing-bias* y la presión de selección que ejerce sobre las comunidades ambientales el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento delimitadas en el laboratorio.

Para evaluar adecuadamente y en un mismo modelo la influencia del origen de la muestra, del medio de cultivo y de la exposición metálica es necesario contar con réplicas de secuenciación de cada uno de los cultivos. En ese caso, Warton *et al.* (2012) y Wang *et al.* (2012) proponen la construcción de modelos que contemplen la relación promedio-varianza utilizando una distribución no lineal de las abundancias de los taxones. Dado que, por

cuestiones económicas, no fue posible realizar réplicas de todos los consorcios, la influencia de la exposición metálica se testeó en forma independiente por fuera del modelo.

La exposición a los distintos metales mostró diferente tolerancia de acuerdo con el metabolismo (los consorcios acidófilos son mucho más resistentes que el resto, como se vio en el **Capítulo 2**). No obstante, la exposición a metales no mostró un efecto significativo sobre el perfil microbiano de los consorcios, independientemente del metal utilizado y del metabolismo del consorcio. Esto difiere de reportes previos; por ejemplo, Jiao *et al.* (2016) mostraron la divergencia progresiva a la comunidad original que provocaban sucesivos enriquecimientos (en batch) con exposición a diferentes contaminantes orgánicos; también demostraron que la naturaleza del contaminante era determinante en los cambios generados y en los microorganismos seleccionados. En este trabajo de tesis, no se analizaron los cambios progresivos en los consorcios por exposición sucesiva a los metales (es decir, sólo se analizaron las composiciones microbianas de los consorcios no expuestos y de los consorcios resistentes al final de la adaptación); a pesar de ello, el leve efecto de la exposición metálica (que permitió, por ejemplo, que los consorcios expuestos pudieran agruparse entre sí) sugiere, en concordancia con los resultados previos, que los microorganismos presentes en los consorcios no expuestos y en las comunidades originales ya eran –en su mayoría– resistentes a los metales usados (justificado por la presencia de genes de resistencia en esos primeros consorcios).

Estos resultados resaltan, a su vez, la mayor versatilidad de los consorcios en comparación a los cultivos puros, y las ventajas que significa en consideración de las posibles aplicaciones biotecnológicas (Briones & Raskin, 2003; Burmølle *et al.*, 2006; Brenner *et al.*, 2008). Como se ha mencionado, esta cualidad es particularmente relevante en el caso de los consorcios extremófilos que tienden a ser poli-resistentes (Raddadi *et al.*, 2015; Orellana *et al.* 2018).

Para obtener una visión más completa de los consorcios estudiados, los análisis de abundancia de taxones se completaron con un análisis de

funcionalidades (Arenas *et al.*, 2006; Flynn & Palmer, 2011; Fetzer *et al.*, 2015). Dentro de los métodos desarrollados para inferir las funcionalidades de un consorcio/comunidad a partir de los datos de secuenciación de 16S ARNr, se destacan Picrust (Langille *et al.*, 2013), Tax4Fun (Aßhauer *et al.*, 2015) y PAPRICA (Bowman & Ducklow, 2015). Estos métodos hacen uso de árboles filogenéticos y de datos de secuenciación genómica disponibles en repositorios (ver **Materiales y métodos 3.2.6**) e implican una doble inferencia: la inferencia de la asignación taxonómica de la secuencia del amplicón y la de las funciones posibles para esa taxonomía a partir de su filogenia.

Las conclusiones obtenidas a través del análisis de la funcionalidad coincidieron con las obtenidas a través del análisis de la filogenia. Así, las rutas metabólicas de los consorcios se agrupan de acuerdo con su metabolismo. Del mismo modo, la comunidad AL resultó funcionalmente más cercana a los consorcios acidófilos, mientras que la comunidad de SA fue funcionalmente más parecida a los consorcios anaeróbicos organótrofos. Este último resultado está directamente relacionado a la composición de la comunidad que mostró abundancia prevalente de géneros de microorganismos anaeróbicos como *Geothrix*, *Paludibacter* y *Anaeromyxobacte*, los cuales, curiosamente, no fueron los géneros prevalentes en los consorcios. Esta es una diferencia importante entre un análisis filogenético de abundancias y un análisis de funciones: dos microorganismos de géneros diferentes –aunque filogenéticamente relacionados– implican disimilitud en un análisis de taxones, pero sumarán rutas similares en un análisis funcional.

No se observaron diferencias en la cantidad de rutas metabólicas entre las comunidades y los consorcios. A su vez, la funcionalidad de los consorcios no fue afectada significativamente por la exposición a metales indicando que, en este caso, el proceso de selección no repercutió en las capacidades funcionales. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, existen numerosos reportes del debilitamiento que produce en la capacidad funcional de una comunidad microbiana la presencia de un compuesto tóxico siendo éste un aspecto a considerar en relación con su *salud ecológica* (Stefanowicz *et al.*, 2008,

2009; Anderson *et al.*, 2009; Azarbad *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2016; Sutcliffe *et al.*, 2017; Frossard *et al.*, 2018; Jacquiod *et al.*, 2018;). La escasa influencia de la presencia de los metales sobre la funcionalidad de los consorcios, además de la falta de correlación entre la diversidad alfa y sus capacidades metabólicas, sugiere la existencia de redundancia funcional en la comunidad original; esto significa que distintos microorganismos serían capaces de desarrollar las mismas funciones (ocupar los mismos *nichos*) y reemplazarse mutuamente en función de cómo las condiciones favorezcan/desfavorezcan a uno u otro. Probablemente, la redundancia funcional observada en la región de Caviahue-Copahue está originada en su naturaleza altamente inestable y extrema. Esta condición es esperable en los ambientes naturales cuyas condiciones fluctúan frecuentemente: las comunidades microbianas autóctonas deberían ser redundantes para evitar que el sistema colapse rápidamente (Mori *et al.*, 2013; Louca *et al.*, 2018; Avila-Jimenez *et al.*, 2020; Ayala-Muñoz *et al.*, 2021). Para confirmar esta hipótesis son necesarios estudios metagenómicos (más allá del gen 16S ARNr) y transcriptómicos que están fuera del alcance de este trabajo de tesis.

La comunidad de AL estaba dominada casi exclusivamente por dos géneros: *Acidithiobacillus* y *Sulfobacillus*. Ambos son géneros de bacterias acidófilas con capacidad de oxidar hierro y/o azufre y reportadas usualmente en este tipo de ambientes (Justice *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Nuñez *et al.*, 2016, 2017); algunas especies de ambos géneros son termófilos moderados que podrían desarrollarse en las condiciones de estos cultivos. En cambio, la comunidad de SA no mostró la dominancia de un género particular, presentando géneros de anaerobios no sulfato-reductores (*Geothrix*, *Paludibacter* y *Anaeromyxobacter*), sulfato-reductores (*Geobacter* y géneros de las familias Desulfobulbaceae y Desulfobacteraceae), así como también, aerobios acidófilos litótrofos (*Acidocella*, *Acidiphilium*, *Ferroplasma*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*). Lopez Bedogni *et al.* (2020) estudiaron la biodiversidad del Río Agrío a lo largo de su curso y encontraron que la composición microbiana de SA era significativamente diferente a la del resto del río (donde prevalecían microorganismos acidófilos relacionados al metabolismo del hierro y el azufre de los géneros *Ferroplasma*,

Acidithiobacillus, *Sulfobacillus* y *Leptospirillum*); esta diferencia estaría vinculada con el mayor valor de pH y menores contenidos en hierro y azufre que presenta SA respecto del tramo del Río Agrio previo al Lago Caviahue.

Del mismo modo que en las comunidades originales, los consorcios de AL estaban dominados únicamente por uno o dos géneros mientras que en los consorcios de SA se apreció abundancia de varios géneros; esto está directamente relacionado con los índices de diversidad alfa discutidos previamente. El género *Paenibacillus* (vinculado al ASV 1) dominó los consorcios aeróbicos organótrofos resistentes de AL mientras que el género *Lysinibacillus* (relacionado al ASV 2) lo hizo en el consorcio no expuesto a metales y mantuvo su presencia en los consorcios resistentes a cadmio y cobre. Los microorganismos del género *Paenibacillus* han sido aislados en diversos ambientes, pero frecuentemente son reportados en suelos y asociados a plantas en ambientes rizofóreos. Estas bacterias poseen gran potencial biotecnológico como promotores de crecimiento vegetal (PGP) y, además, algunas especies de este género producen compuestos antimicrobianos, exopolímeros y enzimas de interés como amilasas, celulasas, hemicelulasas, lipasas, deshidrogenasas, etc. (Grady *et al.* 2016). El género *Lysinibacillus* consiste en bacilos Gram-positivos que han sido aislados de diversos ambientes, incluyendo algunos impactados antropológicamente (Ahmed *et al.* en 2007). Algunas de las especies de este género han mostrado resistencia a compuestos orgánicos (Azmatunnisa *et al.*, 2015; Begum *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2010), boro (Ahmed *et al.*, 2007; Miwa *et al.*, 2009), manganeso (Liu *et al.*, 2013) y a otros contaminantes (Kan *et al.*, 2020).

La comunidad AL original y los consorcios litótrofos acidófilos resistentes obtenidos a partir de ella tuvieron al género *Acidithiobacillus* (representado principalmente por el ASV 6) como dominante, con la excepción del consorcio resistente a cobre en el que predominó *Ferroplasma* (ASV 3), éste también fue dominante en el consorcio no expuesto y estuvo presente en el consorcio resistente a níquel. La presencia de *Acidithiobacillus* en ambientes acidófilos y de alta carga metálica es ampliamente conocida (Huang *et al.*, 2016; Nuñez *et al.*, 2016, 2017); de igual manera, las arqueas del género *Ferroplasma* también han sido

reportadas en ambientes similares y su resistencia a cobre ha sido aprovechada para el desarrollo de procesos de biolixiviación de sulfuros minerales cuprosos como la calcopirita y la calcosina (Golyshina *et al.*, 2000; Dopson *et al.*, 2004; Golyshina & Timmis, 2005; Hawkes *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008; Merino *et al.*, 2016).

El ASV 6 mostró identidad con la cepa de referencia de *A. caldus* estudiada por Valdes *et al.* (2009). Se trata de una especie termófila moderada – aunque con flexibilidad para desarrollarse por fuera del rango óptimo –, quimiolitótrofa, capaz de obtener energía a través de la oxidación de azufre elemental y otros compuestos de azufre reducido. A diferencia de otras especies del género, en el genoma de *A. caldus* no se han identificado genes que codifiquen para la rusticianina, una enzima transportadora de electrones con un rol clave en el metabolismo de oxidación de hierro; consecuentemente, esta especie no posee actividad hierro-oxidante conocida. Por otro lado, la cepa tipo del género *Ferroplasma* (*F. acidiphilum*) es autótrofa y aeróbica obligada, capaz de crecer únicamente a través de la oxidación de Fe(II) y Mn(II) (Golyshina *et al.*, 2000); sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento es 35°C, la cual es bastante inferior a la del ambiente de AL y a la de incubación de los cultivos (45°C). Hawkes *et al.* (2006) y Zhou *et al.* (2008) reportaron el aislamiento de microorganismos mesotermófilos relacionados a *F. acidiphilum*, y propusieron nuevas especies dentro del género; estos aislamientos continúan siendo estudiados. Aunque fuera de los alcances de este trabajo de tesis doctoral, resultará interesante el aislamiento del microorganismo correspondiente al ASV 3 y su caracterización para obtener precisiones respecto a su afiliación.

En los cultivos correspondientes de AL, se observó un marcado descenso de pH, lo que sugiere la oxidación de azufre; al mismo tiempo, también se comprobó la oxidación de Fe(II) que, al no poder ser catalizada por *A. caldus*, sugiere la existencia de un microorganismo oxidante de hierro. En los consorcios en que estuvo presente, *Ferroplasma* podría explicar esta actividad. Es importante aquí hacer una digresión: si bien el ASV 6 mostró identidad con la cepa de referencia de *A. caldus*, también lo mostró con la cepa denominada HV2/2

(Número de acceso: HM070043.1) que fuera aislada de la región volcánica de Hveravellier, Islandia, por Huber *et al.* (1986) y estudiada luego por Klingl *et al.* (2011). Estos últimos comprobaron la cercanía filogenética de HV2/2 con *A. caldus* a partir de la secuencia del gen 16S ARNr; sin embargo, reportaron que esta cepa podía crecer utilizando pirita y Fe(II), entre otras fuentes de energía. Debido a esta –aparente– capacidad de oxidar hierro y azufre (semejante a la manifestada por *A. ferrooxidans*) propusieron que la cepa aislada era una nueva especie, *A. striatothermus* sp. nov. No obstante, esto no fue ratificado posteriormente.

En los consorcios aeróbicos organótrofos de SA, especialmente en los consorcios no expuestos y los resistentes a cobalto y níquel, se determinó presencia de *Lysinibacillus* (representado por el ASV 2, el mismo que se presentó en AL). En los consorcios resistentes a cadmio, zinc y cobre dominó el género *Bacillus*, que también estuvo presente en el consorcio no expuesto, aunque se trató de secuencias diferentes (ASV 5 y ASV 9). Los microorganismos de este género son encontrados en suelos de todo tipo; su capacidad de formar esporas les permite sobrevivir en condiciones extremas (Nicholson *et al.*, 2000) incluyendo altas temperaturas (Sakil Munna *et al.*, 2015). En dos de esos consorcios (SAoCd y SAoZn) se observaron cambios en la viscosidad sugiriendo la presencia de compuestos poliméricos extracelulares (ver **Capítulo 2**); precisamente, algunas especies de *Bacillus* (particularmente *B. subtilis* y *B. cereus*) han mostrado su capacidad de sorber metales a través de la producción de biopolímeros extracelulares (Zeng *et al.*, 2020; Al Azad *et al.*, 2020).

Los consorcios litótrofos acidófilos de SA mostraron un cambio en el metabolismo predominante durante el proceso de adaptación a metales pesados. Los consorcios resistentes a cadmio y zinc exhibieron un metabolismo hierro-oxidante, mientras que los consorcios resistentes a cobre, cobalto y níquel manifestaron el viraje hacia un metabolismo heterotrófico. A pesar de ello, el género *Acidiphilium* (representado por el ASV 4) prevaleció en todos los consorcios, exceptuando el resistente a cobre. Este género de bacterias Gram-negativas heterotróficas incluye algunas especies con capacidad de utilizar

Fe(III) como último aceptor electrónico reduciéndolo bajo condiciones de anaerobiosis (Johnson & McGinness, 1991; Blake, 1992; Bilgin *et al.*, 2004). Probablemente, la baja resistencia a cobre de *Acidiphilium* (comparada con la que presenta este género frente a otros metales) podría justificar su ausencia en el consorcio resistente respectivo (Delabary *et al.*, 2017; Dopson *et al.*, 2003). El otro género relevante en este metabolismo fue *Alicyclobacillus* (relacionado a los ASV 7 y ASV 11), el cual dominó el consorcio SAaCu –con metabolismo heterotrófico– y estuvo presente en los consorcios SAaZn y SAaCd –ambos con actividad hierro-oxidante–. Estos microorganismos son termófilos que han sido aislados en *hotsprings* y en ambientes mineros (Hiraishi *et al.*, 1997; Nicolaus *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2009), y su metabolismo es esencialmente heterotrófico; aunque algunas especies han mostrado la capacidad de oxidar hierro y azufre (Dufresne *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2009). Probablemente, su presencia en los consorcios SAaZn y SAaCd podría explicar la actividad hierro-oxidante observada; por otro lado, la predominancia de *Acidiphilium* –heterótrofo– y la ausencia de *Alicyclobacillus* –litótrofo– en los consorcios SAaNi y SAaCo puede explicar el viraje hacia un metabolismo basado en el extracto de levadura y la pérdida de la actividad hierro-oxidante determinada en estos dos consorcios. En SAaCu, aunque sólo *Alicyclobacillus* estuvo presente, no se determinó actividad hierro-oxidante. En este cultivo, debido a la inhibición de *Acidiphilium* por la presencia de cobre, *Alicyclobacillus* fue el principal heterótrofo presente; probablemente, en estas condiciones predominó el metabolismo heterotrófico (consumo de extracto de levadura), ya que tiene mucho mayor rendimiento energético que el litótrofo (oxidación de hierro).

En los consorcios organótrofos anaeróbicos no se determinaron géneros dominantes y cada consorcio tuvo una composición particular. En general, dominó la clase Clostridia, pero también se presentaron géneros sulfato-reductores como *Desulfovibrio* (ASV 18 y ASV 30) y *Desulfatirhabdium* (ASV 22). En varios consorcios se presentó el género *Cellulomonas* (vinculado mayormente a los ASV 12 y ASV 13), cuyas especies son, en su mayoría, anaerobias facultativas (Poulsen *et al.*, 2016) con la interesante capacidad de degradar celulosa (el

biopolímero más abundante en la tierra) y con potencial en la producción de biocombustibles alternativos a los basados en el petróleo (Himmel *et al.*, 2010). Lamentablemente, los intentos realizados para seleccionar estos microorganismos en enriquecimientos con celulosa fueron infructuosos.

La ocurrencia de taxones bajo distintas condiciones permite identificar organismos con potencial de bioindicador. A diferencia de los indicadores fisicoquímicos (concentración de un compuesto determinado, carga de carbono, salinidad, conductividad, potencial redox, porcentaje de oxígeno disuelto, etc.), los bioindicadores son un reflejo directo de la situación de la biosfera de un ecosistema y permiten hacer un diagnóstico más certero sobre su *salud*, así como predecir su comportamiento en el futuro. En ese sentido, los bioindicadores ofrecen un panorama que excede el momento y el sitio exacto de muestreo, pudiendo dar indicios de eventos previos en ese ambiente y que podrían ser efectos indirectos de un evento no considerado inicialmente. Los indicadores químicos, en cambio, representan sólo una instantánea del momento y del sitio específico muestreado. El uso de microorganismos bioindicadores, debido a su elevada tasa de duplicación, ofrece generalmente respuestas significativamente más rápidas a los cambios en comparación con la que pueden proporcionar los macroorganismos. Además, los microorganismos bioindicadores son capaces de detectar concentraciones de compuestos extremadamente bajas, generalmente inocuas para organismos superiores, y que requerirían el uso de equipamiento de muy alto costo en el laboratorio para ser determinadas (Holt & Miller, 2011).

En este trabajo de tesis, se identificaron aquellas secuencias (ASVs) que tuvieron comportamiento diferencial en los consorcios expuestos a metales respecto a los no expuestos. Estas secuencias, tanto las que fueron seleccionadas positivamente como aquellas que *se perdieron* tras la presión metálica en los consorcios resistentes (selección negativa), podrían representar a microorganismos con potencial indicador para procesos de monitoreo en la región. Caviahue-Copahue no presenta riesgos de contaminación metálica por actividad industrial (ya que se encuentra dentro del área protegida del Parque Provincial Copahue, Neuquén); no obstante, es importante realizar un monitoreo

microbiológico del lugar que permita analizar los cambios en el ecosistema provocado por la actividad volcánica. Por otro lado, la creciente actividad turística que recibe la región puede producir un incremento significativo en la polución si no se toman las medidas de protección apropiadas; precisamente, en tiempos recientes, el Lago Caviahue (en cuyas orillas se asienta la localidad homónima) ha sufrido situaciones de derrames de efluentes residenciales sin tratar que se suman a las pequeñas –pero cotidianas– contaminaciones por descarte de plásticos y otros desechos relacionados a la actividad humana.

Los bioindicadores dan señales que se utilizan como alertas prematuras de alguna condición particular (en este caso, dirigidos hacia la presencia de metales) y, en general, pueden extrapolarse a ambientes similares conservando su función preventiva. Para que esto se cumpla, los bioindicadores deben presentar ciertas características: tener una moderada respuesta a los cambios ambientales (si son demasiado sensibles, pueden perderse frente al cambio mientras que si tienen excesiva tolerancia no experimentarán cambios mensurables), tener una abundancia y una distribución normal (no puede tratarse de una especie *rara*, ya que su determinación podría ser dificultosa y podría verse limitada a condiciones ambientales locales, ni tampoco ubicua y abundante, ya que no sería sensible a los cambios), y, por último, debe tratarse de un microorganismo conocido y estudiado taxonómicamente y fisiológicamente (Holt & Miller, 2011).

Para analizar el carácter *universal* de las secuencias con potencial bioindicador seleccionadas y la posibilidad de utilizarlas en ambientes similares, se analizaron las secuencias idénticas encontradas en la base de datos de NCBI, analizando el tipo de ambiente en donde fueron encontradas y la región geográfica. De esta manera, se buscó determinar la correlación –de existir– de las secuencias con las condiciones ambientales selectivas (es decir, la ocurrencia de los microorganismos en ambientes con presencia metálica). Como control de este análisis, se seleccionaron también aquellas secuencias (ASVs) que estuvieron presentes en todos los consorcios, tanto expuestos como no expuestos. Estas secuencias corresponderían a microorganismos *neutrales* que, hipotetizamos,

deben ser encontradas más frecuentemente y en ambientes diversos. Esta hipótesis fue corroborada parcialmente ya que muchas de las *secuencias neutrales* habían sido reportadas considerablemente más veces que las *secuencias positivas*, sugiriendo una ocurrencia habitual. Independientemente de esta confirmación parcial, aquella hipótesis está condicionada por varios factores. Así, la cantidad de reportes de un mismo organismo podría estar sesgada si éste presenta un interés específico. Además, la cantidad de reportes es dependiente del tipo de ambiente y de la región: resulta seguramente más frecuente el estudio de la biósfera de sitios contaminados o de cierto interés comercial (la rizosfera de un cultivo, por ejemplo) que de la biósfera de un bosque prístino. También es probable que los reportes de países centrales sean más frecuentes que los de países periféricos, como una consecuencia de la inversión en ciencia y tecnología y de los intereses de cada región. Estos condicionantes indican que es necesario incluir en el análisis de ocurrencia de las secuencias, el tipo de ambientes donde se ha realizado cada aislamiento particular y su ubicación geográfica. De esta manera, si un microorganismo es reportado en diversas locaciones y ambientes, es porque ciertamente es *ubicuo*, independientemente de su interés, en particular si la cantidad de reportes es elevada. Por otro lado, un microorganismo de interés que es *raro* (es decir, solo ocurre en condiciones muy particulares), podrá presentar muchos reportes, pero seguramente éstos estarán limitados a pocas locaciones y a ambientes particulares del mundo.

Algunas secuencias (*positivas* y *neutrales*) no se encontraron en la base de datos indicando que se trataría de microorganismos autóctonos desarrollados únicamente en la región de estudio o de muy baja ocurrencia global; también es posible que correspondan a microorganismos no cultivables que aún no han sido aislados por requerimientos específicos para su desarrollo. Entre estas secuencias *únicas* se destaca el ASV 3 (*Ferroplasma*) discutido previamente, sobre la que existe la presunción de que sea una especie aún no reportada dentro del género.

Luego del análisis del tipo y ubicación del ambiente donde se realizaron los aislamientos de cada *hit*, se determinó que las secuencias *neutrales* habían sido encontradas en ambientes de características diversas (prístinos, extremos,

impactados) y que se distribuían, prácticamente, en todas las regiones del mundo. Esto confirma, más allá de la frecuencia de sus reportes, su adaptabilidad, versatilidad, tolerancia y ubicuidad. Si bien estos microorganismos (que también eran, en general, los de mayores abundancias) no tienen potencial para ser usados como bioindicadores, aquellas características los convierten en adecuados para muchos procesos biotecnológicos (tratamiento de efluentes, biohidrometalurgia, promoción de crecimiento vegetal en suelos agrícolas disminuidos o impactados, etc.).

Por otro lado, algunas secuencias *positivas* se reportaron tanto en ambientes impactados o extremos (con presencia metálica) como en ambientes – en principio – prístinos. La ausencia de correlación con la presencia de metales sugiere que no serían bioindicadores adecuados, aunque son necesarios estudios más minuciosos sobre cada uno de ellos para ratificar – o no – esta conclusión.

De las secuencias seleccionadas, sólo dos resultaron promisorias como bioindicadores; ambas provenían de la muestra de AL, que es un ambiente con condiciones (de temperatura y pH) *más extremas* que las de SA. El ASV 7, clasificado como *Alicyclobacillus* sp., sólo presentó secuencias idénticas aisladas de ambientes mineros que están asociados con alta carga de metales. No obstante, su distribución no es global y los reportes encontrados corresponden a cuatro aislamientos realizados en una misma región (Mengzi, provincia de Yunnan en China. Números de acceso: MT605217, MT605216, MT605215, MW627501). La caracterización de sólo tres de ellos está publicada en el artículo de Liang *et al.* (2019), mientras que la otra secuencia fue reportada en febrero del 2021 y no ha sido publicada en ningún artículo específico hasta el momento.

La otra secuencia promisoriosa fue el ASV 6, clasificado como *Acidithiobacillus caldus*, para la cual todos los reportes (alrededor de 80) provenían de ambientes extremos con alta carga metálica (incluyendo pilas y columnas de biolixiviación). Esta secuencia mostró una distribución global, habiéndose encontrado en *hotsprings* de Los Azufres (México), Kamchatka (Rusia), Hveravellier (Islandia) y Yellowstone (EEUU), en drenajes ácidos de mina en

China (Dexing Copper Mine) y en bioprocesos de lixiviación realizados en Rusia y Australia. Uno de los reportes corresponde a la secuencia MN218417 que refiere a la cepa tipo de referencia ATCC 51756 de esta especie y que fuera caracterizada por Valdes *et al.* (2009) como se mencionó previamente. En un estudio posterior sobre la estructura filogenética del género *Acidithiobacillus* (Nuñez *et al.*, 2017), se distinguieron cuatro linajes para *A. caldus* denominados 1A, 1B, 1C y 1D. El primero agrupa aislamientos en diferentes locaciones del mundo, pero principalmente relacionadas con procesos biomineros; los clados 1B y 1C corresponden a aislamientos en sitios mineros de China y de regiones geotermales; por último, el clado 1D incluye aislamientos de sitios mineros norteamericanos. De acuerdo con la clasificación hecha por Nuñez *et al.* (2017), las secuencias idénticas al ASV 6 correspondían al clado 1A; no obstante, de las 80 secuencias idénticas al ASV 6 que fueron encontradas en este trabajo de tesis, sólo había 12 de las utilizadas por Nuñez *et al.*, por lo que la asignación del ASV 6 al clado 1A no es realmente concluyente. De todos modos, en base a su ocurrencia global y a la consistencia de su aparición específicamente en ambientes con alta carga metálica, el ASV 6 podría ser un bioindicador adecuado, y alienta estudios específicos al respecto.

3.5. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha profundizado el estudio de los consorcios obtenidos alcanzando mayores precisiones sobre los mecanismos de resistencia que les permiten desarrollarse en condiciones de elevada concentración metálica.

La mayoría de los consorcios presentaron al menos un gen codificante para una proteína de exclusión molecular (bomba de eflujo). Esto concuerda con lo reportado en literatura respecto a la ocurrencia frecuente de este tipo de mecanismo en microorganismos extremófilos. El sistema *czc*, que confiere resistencia por exclusión a cadmio, zinc y cobalto, estuvo presente en todos los consorcios expuestos a estos metales, con una única excepción. Su ubicuidad está justificada por su versatilidad (ya que actúa sobre diferentes metales) y porque el operón correspondiente está codificado en elementos móviles. Este mecanismo de resistencia probablemente se ha *socializado* entre los microorganismos de la comunidad a través de la transferencia horizontal de genes; precisamente, la acción de este fenómeno de transferencia podría explicar la escasa variabilidad en la composición microbiana tras la exposición a metales, generando consorcios versátiles y poli-resistentes sin gran pérdida de diversidad respecto de la comunidad original.

La presencia del sistema *czc* en la mayoría de los consorcios podría explicar porque no se detectaron mecanismos de resistencia específicos para zinc. No obstante, resultó llamativa la ausencia del transportador *zntA*, usual en bacterias similares a las encontradas en los consorcios.

La resistencia a cobre estuvo asociada a la bomba de eflujo *copA* y, en los consorcios con presencia de Gram-negativos, también al sistema *pco* que actúa desde el periplasma en este tipo de bacterias. La presencia de *pco* en lugar del sistema *cus* (que cumple idéntica función, aunque no fue detectado) podría deberse a que su operón se encuentra en plásmidos (mientras que *cus* es un operón cromosómico) lo que facilitaría su transferencia horizontal.

Finalmente, la ausencia de mecanismos específicos para níquel aun en los consorcios con alta resistencia a este metal sugiere la existencia de nuevos mecanismos aún no conocidos y/o de la necesidad de nuevos estudios variando las condiciones en las que se realizaron las amplificaciones en este trabajo.

El mecanismo prevalente, en el caso de los consorcios anaeróbicos, fue la precipitación por generación de sulfuros —ya sugerido en el **Capítulo 2**— que se justifica por la presencia de taxones relacionados a microorganismos sulfato-reductores y por la ausencia de mecanismos de exclusión específicos (al menos, de aquellos testeados en este trabajo), con la excepción del consorcio resistente a cobalto. En este último, la capacidad de crecer en concentraciones considerablemente elevadas del metal justifica el requerimiento de un mecanismo adicional de resistencia.

Dos casos particulares son los consorcios organótrofos de SA, SAoCd y SAoZn, los cuales habían exhibido un cambio de viscosidad del medio de cultivo sugiriendo la producción de polímeros extracelulares. Si bien esto no se analizó genéticamente, sí se determinó que estos consorcios estaban dominados por el género *Bacillus*, el cual está asociado en la literatura con la producción de EPS y a su uso en procesos de biosorción. Resultado que motiva avanzar en el estudio de estos consorcios para procesos de este tipo.

Las condiciones de cultivo ejercieron una gran presión de selección sobre la comunidad original y fueron la variable determinante en el *moldeado* de la composición microbiana y funcional de los consorcios. La exposición a los metales no afectó al perfil microbiano ni las capacidades funcionales de los consorcios, que resulta destacable considerando que las resistencias demostradas eran superiores a la de la mayoría de los microorganismos reportados. Esto demuestra la naturaleza poli-resistente de la comunidad y, probablemente, la *socialización* de los genes específicos de resistencia que ya se encontraban en los consorcios no expuestos. La ausencia de correlación entre la diversidad y la capacidad funcional sugiere la existencia de redundancia funcional en la comunidad original que justifica su versatilidad.

La comunidad de Agua de Limón estuvo dominada por microorganismos recurrentes en este tipo de ambientes (*Acidithiobacillus* y *Sulfobacillus*); en cambio, la comunidad de Salto del Agrio, vinculado a la mayor complejidad de ese ecosistema, se mostró mucho más diversa con prevalencia de microorganismos anaeróbicos y presencia de acidófilos habituales (*Acidocella*, *Acidiphilium*, *Ferroplasma*, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*). Por su parte, los microorganismos que se seleccionaron en los consorcios (tanto resistentes como no expuestos) pertenecían a géneros usualmente reportados en condiciones extremas similares: *Acidithiobacillus*, *Ferroplasma*, *Alicyclobacillus* en condiciones acidófilas, y *Bacillus* y otros géneros de la familia Bacillaceae en condiciones aeróbicas organotróficas de pH neutro. Sin embargo, muchos taxones no encontraron secuencias idénticas en la base de datos utilizada, sugiriendo también la posibilidad de microorganismos autóctonos, de muy baja frecuencia o no reportados. Entre estas secuencias, se encontró una clasificada como *Ferroplasma*, pero que se desarrollaba a 45°C; esta condición mesotermófila sugiere que esta secuencia pertenece a una especie diferente a *F. acidophilum*, arquea mesófila que es la única especie aceptada de este género. La caracterización fisiológica y genómica de esta especie es una de las líneas que ha abierto esta tesis para su exploración posterior.

Un resultado significativo de este trabajo es la identificación de una gran cantidad de secuencias con comportamiento diferencial respecto a la exposición a metales (seleccionadas tanto positiva como negativamente) y que podrían resultar relevantes en un hipotético proceso de biomonitoreo de la región de Cavihue-Copahue. Algunas de estas secuencias, además, demostraron ser funcionales también para ambientes similares del mundo; una de ellas (el ASV 6, clasificado como *Acidithiobacillus caldus*) sólo fue aislada y reportada en ambientes ácidos con presencia de metales (drenajes ácidos y en pilas y tanques de biolixiviación). La caracterización de esta especie como un bioindicador de la contaminación de un ambiente es otra de las líneas que este trabajo de tesis abre para estudios posteriores.

El siguiente capítulo concentra el estudio de aplicaciones biotecnológicas para algunos de los consorcios seleccionados que demostraron cualidades particularmente interesantes en su interacción con los metales. Las aplicaciones biotecnológicas están orientadas a la remediación de metales (biosorción, bioprecipitación) y a la recuperación de metales (biohidrometalurgia).



CAPÍTULO IV

***Potencial biotecnológico
de los consorcios obtenidos:
biorremediación y biolixiviación
de metales pesados***



4.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se han desarrollado y aplicado una gran variedad de metodologías biotecnológicas que compiten y, en algunos casos, desplazan con éxito a ciertos procesos industriales convencionales. Estas metodologías biotecnológicas suelen ser más sencillas de implementar, de mejor costo-efectividad y, usualmente, más amigables desde la perspectiva ambiental. Estas ventajas –y, especialmente, la última– hacen de estos procesos una solución posible para disminuir el riesgo de polución en la que se encuentran numerosos ecosistemas debido a las actividades industriales que suelen llevarse a cabo sin una correcta regulación. De esta manera, las biotecnologías ambientales pueden presentarse como pilares fundamentales para avanzar en un futuro desarrollo sostenible.

En el caso de los metales pesados, existen biotecnologías destinadas a su extracción a partir de los recursos minerales, y a su recuperación a partir de materiales agotados o residuales, en ambos casos ocasionando un menor impacto ambiental que las tecnologías metalúrgicas tradicionales. Debido a que estas metodologías se desarrollan en medio acuoso, las mismas suelen incluirse dentro de la *biohidrometalurgia*, que es el área dentro de la biominería dedicada directamente a la extracción de metales a través de la acción de soluciones acuosas. El proceso por el cual determinados microorganismos actúan sobre la matriz sólida de los minerales para solubilizar los metales en fase acuosa recibe el nombre de *biolixiviación*. Como se ha descrito en el **Capítulo 1**, la biolixiviación se puede aplicar en diversas situaciones, pero, sin dudas, el proceso se asocia casi exclusivamente a la acción microbiana sobre minerales sulfurados, lo que permite la solubilización de diferentes metales de interés comercial. Los microorganismos participantes tienen la capacidad de generar dos agentes lixiviantes: el ion férrico y el ácido sulfúrico, los cuales pueden actuar sobre los sulfuros metálicos disolviéndolos y liberando el metal correspondiente (ver **Capítulo 1**).

También, tal cual se ha descrito en el **Capítulo 1**, existen otras biotecnologías dirigidas al tratamiento de efluentes con alta carga metálica y a la remediación de ambientes ya contaminados con metales pesados (que se incluyen dentro de los procesos de biorremediación). Probablemente, las dos biotecnologías más adecuadas para la remediación de metales son la biosorción, que utiliza biomasa o biopolímeros con capacidad de sorber los metales para poder separarlos de la fase original (usualmente líquida); y la bioprecipitación, que utiliza productos del metabolismo microbiano para la precipitación (inmovilización) de los metales. En este último caso, lo habitual es la utilización de microorganismos sulfato-reductores que generan sulfuros capaces de precipitar junto a muchos metales pesados formando fases sólidas muy estables y de bajo volumen.

En este capítulo se describe el uso de los consorcios microbianos obtenidos para evaluar distintas aplicaciones biotecnológicas para la recuperación y/o remediación de metales. Particularmente, se describirán los estudios realizados para analizar la efectividad de algunos consorcios/microorganismos aislados en tres biotecnologías distintas: biohidrometalurgia, biosorción y bioprecipitación.

4.2. ***Biolixiviación de mineral de cobre***

4.2.1. ***Introducción. Materiales y métodos***

Los consorcios litótrofos acidófilos obtenidos durante este trabajo de tesis fueron evaluados para su potencial aplicación en procesos biomineros.

El proyecto minero Taca Taca está dedicado a la explotación del yacimiento del mismo nombre ubicado en el departamento de Los Andes, Salta, Argentina (**Figura 4.1**).

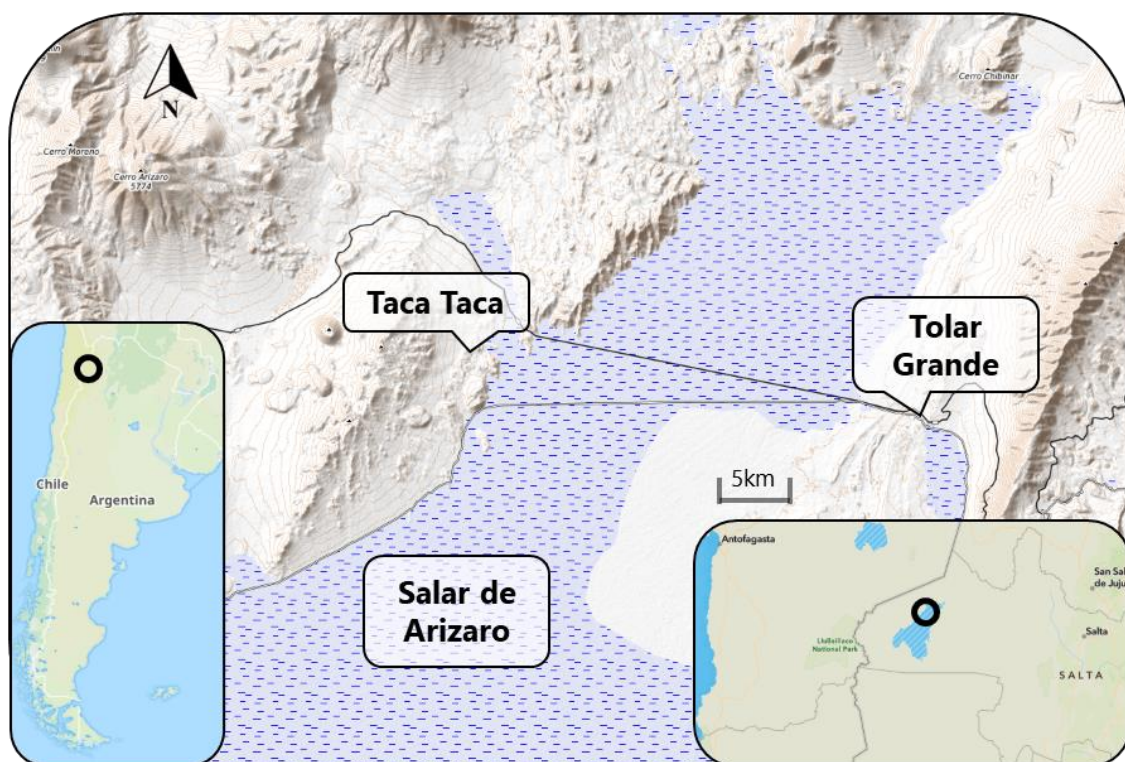


Figura 4.1 – Ubicación del yacimiento Taca Taca en la provincia de Salta, Argentina.

El yacimiento es un pórfido de cobre, oro y molibdeno, cuya exploración parcial se remonta a 1967 y que actualmente es explorado por la empresa Corriente Argentina S.A. De acuerdo con la empresa, este depósito será explotado a cielo abierto y se producirán concentrados de cobre/oro y molibdeno por los métodos convencionales de molienda y flotación. Debido al interés de la

empresa en incorporar metodologías alternativas que pudieran aplicarse no sólo en la concentración sino en la explotación del mineral (como, por ejemplo, la biohidrometalúrgica), se decidió utilizar muestras de mineral de este yacimiento para los estudios de evaluación de la capacidad biolixivante de los consorcios.

La muestra de mineral utilizada provenía de testigos provistos por la empresa encargada del proyecto. La caracterización por fluorescencia de rayos X (FRX) y difracción de rayos X (DRX) mostró que la muestra contenía 1,14% de Cu, 2,61% de S y 2,13% de Fe (**Tabla 4.1**), siendo la calcosina (Cu₂S) y la pirita (FeS₂) las especies mineralógicas principales.

Tabla 4.1 - Composición del mineral de Taca Taca

		µg/g			%		
S	26100	Th	19	Ag	1,6	Al	7,47
P	580	Ga	16	Bi	1,6	K	3,46
Sr	286	W	15	Zr	1,5	S	2,61
Mo	214	Co	14	U	1,2	Fe	2,13
Ba	180	Sc	9,2	Be	1	Cu	1,13
V	86	Cr	9,0	Te	0,5	Mg	0,29
Sb	60	Ni	8,4	Re	0,3	Na	0,28
As	33	Pb	6,4	Cd	0,3	Ti	0,12
Mn	28	Sn	6,0	Tl	0,2	Ca	0,07
La	27	Y	5,4	Au	0,1		
Zn	20	Nb	4				

En los estudios de biolixiviación se utilizaron los consorcios litótrofos acidófilos de Agua de Limón, ALaCu y ALaZn; el primero de ellos estaba dominado por *Ferroplasma* (ASV 3) mientras que el segundo tenía *Acidithiobacillus* como género predominante (ASV 6). Las especies bacterianas de este último género y las arqueas del género *Ferroplasma* han demostrado su capacidad de biolixiviar minerales sulfurados (ver **Capítulo 3, sección 3.3.7**).

El ensayo de biolixiviación se realizó en erlenmeyers con 150 mL de medio MAC cuyo pH fue ajustado en 2 y con 1,5 g de mineral triturado (previamente esterilizado por microondas) que se inoculó con los consorcios mencionados.

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos de los consorcios ALaCu y ALaZn, en medio MAC a pH 2,4, en presencia de hierro (4 g/L) y azufre (10 g/L) e incubados a 45°C (ver **Capítulo 2, sección 2.2.2**). Una vez alcanzado el estado exponencial de crecimiento, los cultivos fueron centrifugados a 8000 g durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 20 mL de medio MAC, cuyo pH fue ajustado en 2 (y que no contenía ni hierro ni azufre). Se realizó un recuento de células al microscopio de este resuspendido y, a partir de ello, se calculó el volumen necesario a agregar en el erlenmeyer de biolixiviación para alcanzar una población de, aproximadamente, 1×10^5 células/mL en la suspensión final.

Además de los sistemas inoculados, se prepararon dos controles: en uno de ellos, el inóculo fue reemplazado por paraformaldehído, para inhibir el desarrollo microbiano nativo de la muestra de mineral (control químico); mientras que en el otro sistema control se utilizó el mineral sin esterilizar y sin inoculación externa, de modo de evaluar la posible acción de los microorganismos nativos. Todos los frascos fueron incubados a 45°C y 150 rpm.

Debido a la posible evaporación, se realizó reposición por agregado de agua estéril cada 24 h a partir de la determinación de la variación de masa de cada sistema. A diferentes tiempos se realizaron muestreos de los sistemas luego de la reposición de agua. Las muestras fueron filtradas a través de membranas de 3 μm de tamaño de poro y, en los filtrados acuosos, se determinó pH y potencial redox (Eh). Además, 1 mL de cada muestra filtrada fue almacenado a -20°C para determinación de Fe(II) por el método de la orto-fenantrolina (ver **Anexo I**) al finalizar el ensayo. Por último, las muestras filtradas fueron centrifugadas a 12 000 g durante 10 minutos y se realizaron diluciones del sobrenadante en solución 0,14 M de HNO₃ para las determinaciones de hierro total y cobre por espectrofotometría de absorción atómica.

4.2.2. Resultados

La **Figura 4.2** muestra la cinética de solubilización de cobre en los diferentes sistemas que contenían el mineral durante los 15 días de duración de la experiencia. Las figuras siguientes (**Figs. 4.3-4.5**) muestran las evoluciones de hierro total soluble, Eh y pH, respectivamente.

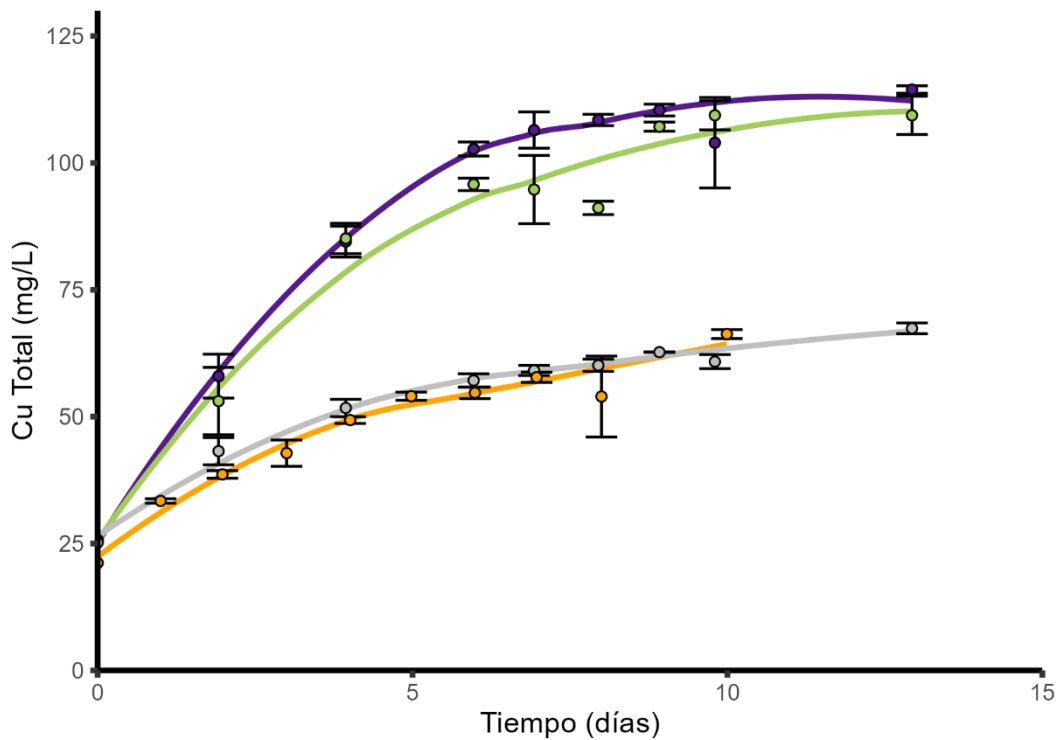


Figura 4.2 - Cinética de la solubilización de cobre durante la experiencia de biolixiviación del mineral de Taca Taca. Los sistemas inoculados corresponden a las líneas en violeta (consorcio ALaCu) y en verde (consorcio ALaZn). Los controles corresponden a las líneas en naranja (sin inocular y sin esterilizar) y en gris (sin inocular y con agregado de paraformaldehído).

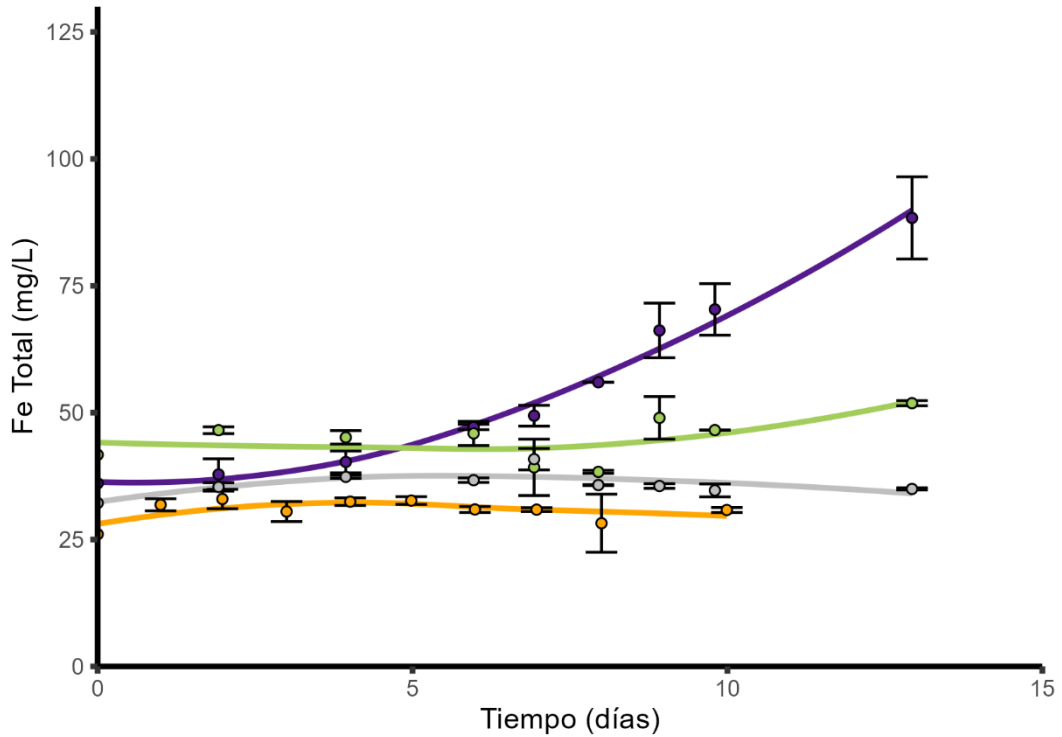


Figura 4.3 – Evolución de la concentración de hierro total soluble durante la experiencia de biolixiviación. Los sistemas inoculados corresponden a las líneas en violeta (consorcio ALaCu) y en verde (consorcio ALaZn). Los controles corresponden a las líneas en naranja (sin inocular y sin esterilizar) y en gris (sin inocular y con agregado de paraformaldehído).

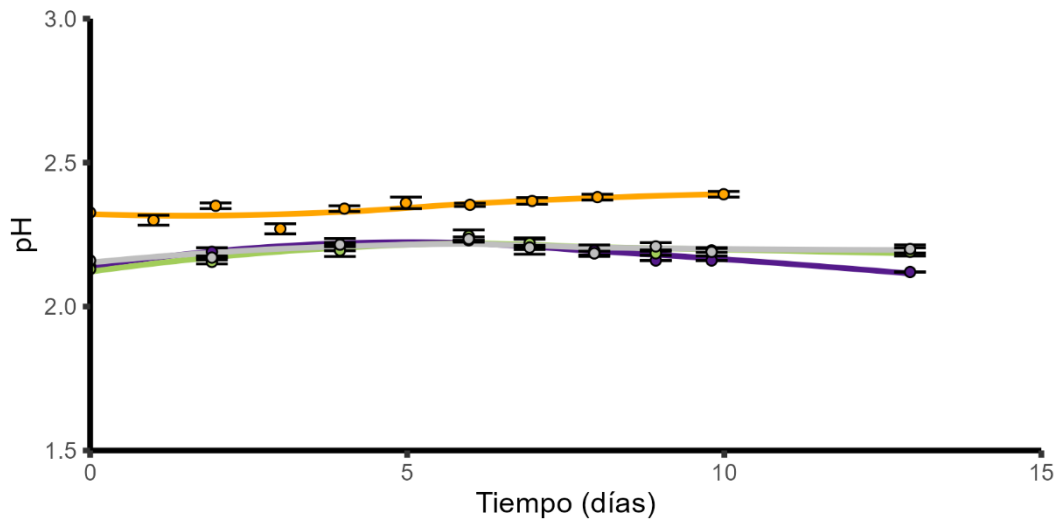


Figura 4.4– Evolución del pH durante la experiencia de biolixiviación del mineral de Taca Taca. Los sistemas inoculados corresponden a las líneas en violeta (consorcio ALaCu) y en verde (consorcio ALaZn). Los controles corresponden a las líneas en naranja (sin inocular y sin esterilizar) y en gris (sin inocular y con agregado de paraformaldehído).

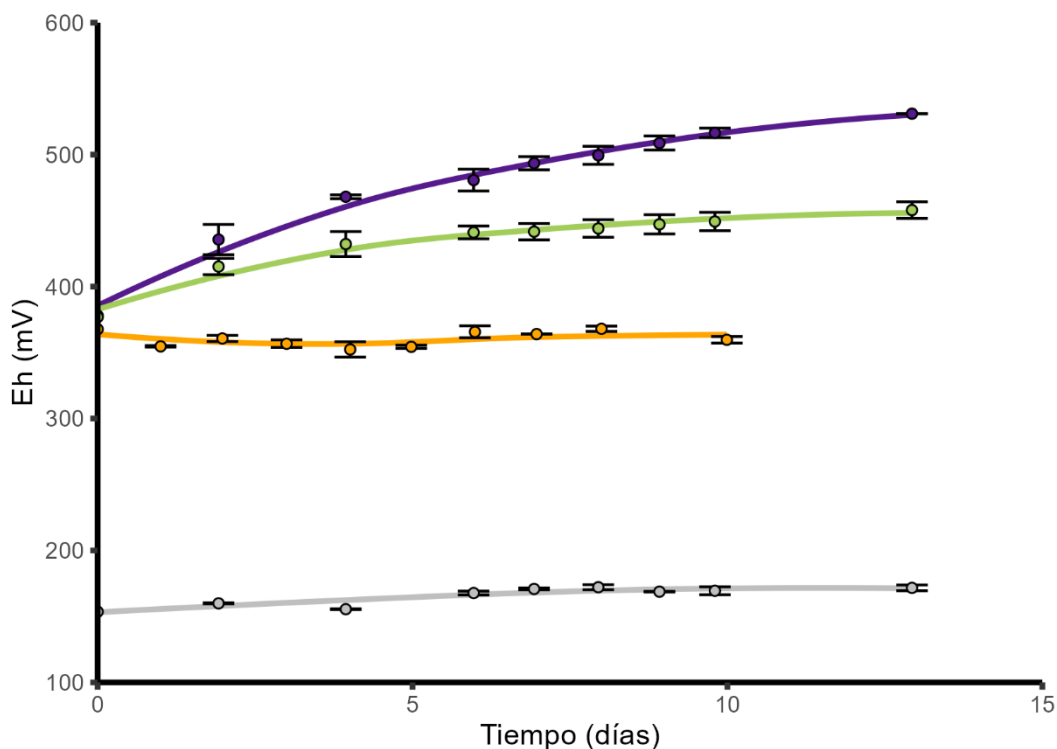
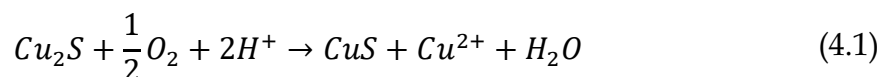


Figura 4.5– Evolución del potencial redox (Eh) durante la experiencia de biolixiviación del mineral de Taca Taca. Los sistemas inoculados corresponden a las líneas en violeta (consorcio ALaCu) y en verde (consorcio ALaZn). Los controles corresponden a las líneas en naranja (sin inocular y sin esterilizar) y en gris (sin inocular y con agregado de paraformaldehído).

De acuerdo con la densidad de pulpa utilizada y con el contenido de cobre del mineral, la máxima recuperación de cobre corresponde a una concentración de 113 mg/L; esta concentración fue alcanzada por el sistema inoculado con el consorcio ALaCu en aproximadamente una semana y por el sistema inoculado con el consorcio ALaZn aproximadamente una semana después. Los controles sólo alcanzaron una solubilización del 50% en el mismo tiempo.

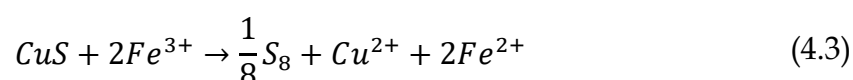
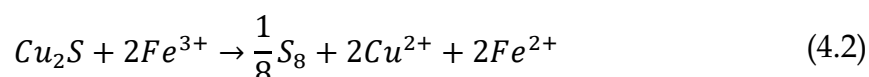
La calcosina puede ser abióticamente solubilizada por acción de ácidos minerales y/o de especies oxidantes. En medios ácidos y oxigenados, la ecuación que interpreta la disolución es la siguiente:



La solubilización registrada en ambos controles (~50%) sugiere que el cobre soluble proviene de este proceso (donde a partir de dos moles de cobre, uno es solubilizado y otro queda bajo la forma de CuS). Este proceso implica un

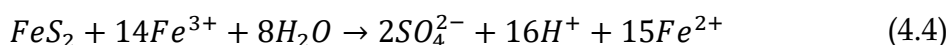
ligero ascenso del pH (aun en ausencia de la capacidad buffer del medio, no debería ser superior a 0,2 unidades de pH) que puede observarse en el gráfico de la **Figura 4.5**. La especie mineralógica formada (covelita, CuS) es de muy baja solubilidad en medios ácidos (excepto que se trate de valores de pH iguales o menores a 1).

La calcosina y la covelita pueden ser atacadas por otros agentes oxidantes como Fe(III) (**ecuaciones 4.2 y 4.3**, respectivamente):



El mecanismo de estos procesos ha sido reinterpretado a través de la formación de polisulfuros (Schippers & Sand, 1999; Sand *et al.*, 2001) (ver **Capítulo 1**), pero la ecuación global es esencialmente la misma.

En los medios utilizados en esta experiencia no hubo suplemento de hierro por lo que su presencia sólo obedece a la disolución del que contiene el mineral. Inicialmente, todos los sistemas contenían una pequeña concentración de hierro soluble (25-40 mg/L) proveniente de la disolución de las especies presentes en el mineral y que requieren sólo la acción ácida del medio. En los controles se observa una ligera disolución posterior. Este comportamiento se debe a que el hierro del mineral se encuentra, principalmente, bajo la forma de piritita que es una especie mineralógica no soluble en ácido. Para disolver esta especie es necesario un ataque oxidante como el que produce, por ejemplo, el Fe(III):

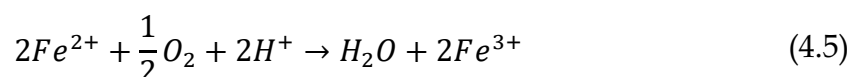


El mecanismo de este proceso ha sido reinterpretado a través del mecanismo del tiosulfato (Schippers & Sand, 1999; Sand *et al.*, 2001), pero el proceso global es el mismo (ver **Capítulo 1**).

En los controles, prácticamente, no hubo generación de Fe(III) ni de otros oxidantes tal cual sugiere el mantenimiento de un Eh constante durante la experiencia. El valor anormalmente bajo del Eh en el control con

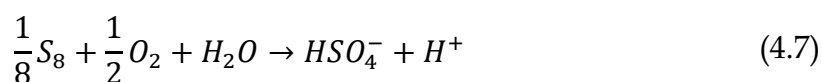
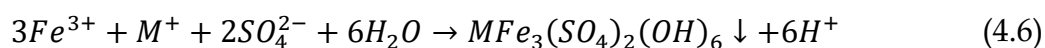
paraformaldehído se debe a la capacidad reductora del formaldehído y no indica alguna diferencia real de comportamiento de los controles o alguna actividad de la flora microbiana nativa de los minerales.

El cultivo que contenía al consorcio ALaCu incrementó la concentración de Fe soluble hasta valores cercanos a 100 mg/L, mientras que el otro cultivo sólo alcanzó aproximadamente 60 mg/L. Esto es compatible con el aumento del carácter oxidante del medio debido a la oxidación de Fe(II) que fue significativamente mayor en el primero de los cultivos. Este comportamiento indica la presencia de microorganismos hierro-oxidantes en los cultivos que son predominantes en el consorcio ALaCu (tal cual, se ha comprobado en el análisis genético). Como se ha mencionado en otros capítulos de esta tesis, estos microorganismos catalizan la oxidación de Fe(II):



El aumento del Eh justifica la disolución de la pirita (y el incremento de la concentración de Fe soluble) y también la mayor solubilización de cobre (respecto de los controles) ya que se activaron los procesos representados por las **ecuaciones 4.2 y 4.3**.

El consumo de protones que implican los procesos **4.1 y 4.5** es compensado (e incluso superado hacia el final de la experiencia) en los sistemas inoculados (y en particular en el que tiene mayor actividad hierro-oxidante) por la liberación de protones en la disolución de pirita (**ecuación 4.4**) y también por la eventual hidrólisis del Fe(III) para formar jarosita (**ecuación 4.6**) y otras fases insolubles y también por la bio-oxidación del S₈ (**ecuación 4.7**):



4.2.3. Conclusiones

Los consorcios litótrofos obtenidos a partir del pozo geotermal de Agua del Limón y, especialmente, el resistente a cobre, demostraron su alta capacidad biolixivante sobre el mineral de Taca Taca, permitiendo la recuperación total de cobre presente en el mineral en un tiempo razonable para un proceso biohidrometalúrgico. Además, esto fue logrado con muy bajo o inexistente consumo de ácido. La importancia de este estudio es la posibilidad de extender este proceso a otros minerales que contengan calcosina teniendo en cuenta que esta especie mineralógica es la segunda en importancia en el mundo debido a sus reservas (la primera es la calcopirita) y la primera si se tiene en cuenta las posibilidades de ser tratada por métodos hidrometalúrgicos.

4.3. Procesos de biorremediación: selección de consorcios

4.3.1. Introducción. Materiales y métodos

Para seleccionar consorcios que tuvieran actividad biorremediante, se analizó el efecto que los cultivos ejercían sobre los metales solubles en el medio. Para ello, se realizaron cultivos de todos los consorcios obtenidos, en el medio y las condiciones específicas apropiadas (ver **Capítulo 2, sección 2.2.2**) en presencia de 10 mg/L de los distintos metales estudiados. Además, se preparó para cada condición, un sistema control donde el inóculo fue reemplazado por medio estéril. Se tomaron muestras inicialmente y cuando el cultivo terminó su desarrollo; las mismas fueron filtradas y diluidas apropiadamente en solución 0,14 M de HNO₃ para la determinación de la concentración de los metales solubles por espectrofotometría de absorción atómica.

Las diferencias observadas entre el comportamiento del metal soluble en cada consorcio y en su respectivo control abiótico, fueron analizadas a través de una prueba t de Student para evaluar la hipótesis nula de que la disminución en los consorcios no era diferente a la observada en el control (si p-valor < 0,01, se rechazó la hipótesis nula).

4.3.2. Resultados

En la **Tabla 4.2** se muestran las diferencias de concentración de los metales en solución al final de la experiencia respecto del valor inicial, corregidas de acuerdo con el comportamiento de los controles. Las mismas fueron calculadas de la siguiente manera:

$$\Delta[M] = ([M]_{x_F} - [M]_{x_0}) - ([M]_{c_F} - [M]_{c_0}) \quad (4.8)$$

donde $[M]_{x_F}$ y $[M]_{x_0}$ son las concentraciones de metal soluble en los cultivos al tiempo final e inicial, respectivamente, y $[M]_{c_F}$ y $[M]_{c_0}$ son las concentraciones de metal en solución en los controles abióticos al tiempo final y al inicio del ensayo, respectivamente. Cada uno de estos términos corresponde al promedio de los triplicados experimentales. En la tabla también se indica la propagación de errores (ΔE), calculada como la suma de las desviaciones estándar de cada triplicado. A través de una prueba t de Student, se determinaron los sistemas para los cuales hubo una disminución significativa de la concentración metálica en el inoculado respecto del observado en el control; esos sistemas se indican en negritas.

Algunos consorcios, como ALaCd y ALaZn, mostraron un aparente aumento en la concentración metálica respecto a sus controles; sin embargo, estos sistemas estuvieron asociados a dispersiones considerables ($\Delta E > 1$ mg/L).

Los consorcios aeróbicos organótrofos de SA resistentes a Cd, Zn y Ni mostraron un descenso significativo en la concentración del metal correspondiente; ese descenso fue de 1 mg/L en los primeros dos casos. Estos dos consorcios ya habían exhibido una disminución del 10% de la concentración metálica soluble al ser expuestos a la máxima concentración que fueron capaces de tolerar (**Capítulo 2, sección 2.3.6**). El cambio de viscosidad del medio e incluso la presencia de una película viscosa, sugirió la presencia de exopolímeros en el medio.

Tabla 4.2 - Efecto de los consorcios sobre los metales en solución (en mg/L)

Consortio	$\Delta[M]$	ΔE	p-valor
SAoCd	-0,9	0,4	0,007
SAoCo	0,4	0,9	0,290
SAoCu	-0,5	0,8	0,236
SAoNi	-0,6	0,3	0,004
SAoZn	-0,9	0,4	0,009
SAaCd	0,3	0,5	0,288
SAaCo	-0,4	0,4	0,073
SAaCu	-0,4	0,3	0,031
SAaNi	0,0	0,2	0,683
SAaZn	0,1	0,3	0,411
SAnCd	-4	1	0,001
SAnCo	-9	1	0,000
SAnCu	-7,5	0,6	0,000
SAnNi	-2,5	0,5	0,001
SAnZn	0,0	0,4	0,694
ALoCd	-0,0	0,5	0,969
ALoCo	-0,2	0,4	0,233
ALoCu	-0,4	0,4	0,095
ALoNi	0,4	0,5	0,179
ALoZn	-0,1	0,4	0,668
ALaCd	1	1	0,101
ALaCo	0,4	0,6	0,275
ALaCu	-0,2	0,8	0,636
ALaNi	0,4	0,6	0,244
ALaZn	1	1	0,259

Los consorcios anaeróbicos, con la única excepción del resistente a zinc, provocaron el mayor descenso en la concentración metálica (entre 15% y 90% de la concentración inicial). Este descenso, tal cual había sido indicado previamente (**Capítulo 2, secciones 2.3.6 y 2.3.7**), estuvo acompañado por la aparición de compuestos insolubles. Estos resultados sugieren actividad sulfato-reductora y formación de sulfuros metálicos de baja solubilidad. El consorcio que provocó el mayor descenso fue SAnCo que, además, había sido el consorcio más resistente (hasta 589 mg/L de Co).

A partir de estos resultados, se seleccionaron tres consorcios como los más promisorios para ser utilizados en procesos de inmovilización de iones metálicos: SAoCd, SAoZn y SAnCo.

4.3.3. Conclusiones

La experiencia realizada fue diseñada para detectar consorcios con potencialidad para ser usado en procesos de biorremediación de metales y específicamente de inmovilización de iones metálicos presentes en un medio líquido. Solo un grupo reducido de los consorcios resistentes mostró capacidad de disminuir la concentración de metal soluble (específicamente, 3 consorcios organótrofos y 4 consorcios anaeróbicos) sugiriendo que la mayoría de los consorcios obtenidos utiliza otras estrategias de resistencia alguna de las cuales fueron abordadas durante el **Capítulo 3**. Ese tipo de estrategias de resistencia no pueden ser utilizadas de modo directo en las metodologías de biorremediación que se evalúan en este trabajo de tesis doctoral.

4.4. Procesos de biorremediación: aislamiento de microorganismos

4.4.1. Introducción. Materiales y métodos

Los consorcios organótrofos mesófilos de Salto del Agrio resistentes a cadmio y zinc, SAoCd y SAoZn, que exhibieron una disminución en la concentración de metal soluble en el ensayo anterior, presentaban una única especie (ASV/OTU) dominante (**Capítulo 3, sección 3.3.7**). Por esa razón, se intentó aislar dicha especie. Si bien el consorcio SAoCo no exhibió una disminución en la concentración de Co en solución, su taxón dominante según la metagenómica, asignado al género *Lysinibacillus*, resultó de interés ya que algunas de las especies de este género han mostrado resistencia a compuestos orgánicos e inorgánicos (boro y manganeso); debido a ello, también se intentó su aislamiento.

Se realizaron cultivos en placas de Petri utilizando medio LB con el agregado del metal correspondiente, Cd, Co o Zn, a la máxima concentración tolerada: 112 mg/L, 59 mg/L y 798 mg/L, respectivamente (ver **Capítulo 2, sección 2.3.3**). Las colonias obtenidas se recuperaron, se resuspendieron y se enriquecieron en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido de igual composición. Los cultivos enriquecidos en medio líquido fueron nuevamente plaqueados en medio sólido para obtener colonias. Este procedimiento se repitió al menos 4 veces para cada muestra. Finalmente, se seleccionaron 3 aislados denominados β , proveniente de SAoCd, ζ , proveniente de SAoZn, y λ , obtenido a partir de SAoCo.

Respecto a los consorcios anaeróbicos, considerando los datos obtenidos a través de la secuenciación (**Capítulo 3, sección 3.3.7**), se intentó el aislamiento de especies sulfato-reductoras de SAnCo (cerca del 40% constituido por *Desulfovibrio* spp.) y especies celulolíticas, del género *Cellulomonas*, de SAnZn y de SAnNi. Estas últimas son de gran interés biotecnológico ya que ofrecen la posibilidad de generar energía a partir de residuos agronómicos (Himmel *et al.* 2010).

El aislamiento de sulfato-reductores se llevó a cabo en placas de Petri incubadas en jarras herméticas en presencia de sobres generadores de anaerobiosis Mitsubishi (Mitsubishi Gas Chemical, Japón) utilizando el mismo medio, PgF, pero disminuyendo la concentración de extracto de levadura a 0,01%. Las colonias obtenidas fueron resuspendidas en tubos tipo Hungate conteniendo 5 mL de medio fresco (previamente burbujeado con N₂ libre de O₂). El procedimiento se repitió 3 veces.

Para la selección de microorganismos celulolíticos se realizaron cultivos líquidos en viales de 50 mL utilizando el siguiente medio (número de catálogo 350 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ), Leibniz Institute, Alemania¹¹): K₂HPO₄ (2,21 g/L), KH₂PO₄ (1,50 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1,30 g/L), MgCl₂·6H₂O (0,10 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,02 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,001 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaHCO₃ (0,80 g/L) y celulosa (5 g/L) en agua destilada a pH 7,4. Los viales fueron luego incubados a 30°C en jarras de anaerobiosis durante 31 días. Como alternativa, se intentó la selección de estos microorganismos utilizando el medio PgF suplementado con 5 g/L de celulosa en las mismas condiciones de incubación.

De cada cultivo de aislado positivo se extrajo el ADN genómico según se describió previamente (**Capítulo 3, sección 3.2.1**). Previamente a ello, 5 mL de cultivo fueron centrifugados a 10 000 g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con PBS dos veces.

El material genético obtenido fue medido en NanoDrop y se realizaron amplificaciones PCR utilizando los *primers* universales 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1541R (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA) para constatar la integridad del mismo en la región de interés.

¹¹ <https://www.dsmz.de/>

Las muestras de material genómico fueron enviadas a MacroGen, Inc. (Corea del Sur) para la secuenciación del gen 16S ARNr completo por el método de Sanger. Los datos de la secuenciación fueron analizados y curados en R utilizando el paquete `sangeranalyseR` (Hill *et al.*, 2014). Las secuencias procesadas fueron identificadas taxonómicamente a través del paquete BLAST+ de NCBI (Camacho *et al.*, 2009) utilizando el algoritmo `megablast` y la base de datos `16S_ribosomal_RNA` descartando aquellas secuencias de la base con longitud menor a 1000 pb.

4.4.2. Resultados

Los tres aislados obtenidos, denominados β (SAoCd), ζ (SAoZn) y λ (SAoCo), fueron identificados a partir de la secuenciación del gen 16S ARNr en sentido *forward* (*primer* 27F) y *reverse* (*primer* 1492R) utilizando la herramienta BLAST+. A continuación, se muestran los *hits* más relevantes (**Tabla 4.3**) para cada secuencia/aislado y lectura (F y R).

Tabla 4.3 – Identificación de los aislados organótrofos mesófilos

Secuencia	AccessNumber	Identidad	Organismo
β _27_F	NR_152692	100	<i>Bacillus wiedmannii</i>
β _27_F	NR_157735	100	<i>Bacillus proteolyticus</i>
β _27_F	NR_170494	100	<i>Bacillus fungorum</i>
β _1492_R	NR_115526	99,747	<i>Bacillus cereus</i>
β _1492_R	NR_043403	99,747	<i>Bacillus thuringiensis</i>
β _1492_R	NR_152692	99,747	<i>Bacillus wiedmannii</i>
β _1492_R	NR_157735	99,747	<i>Bacillus proteolyticus</i>
β _1492_R	NR_157733	99,747	<i>Bacillus pacificus</i>
β _1492_R	NR_157731	99,747	<i>Bacillus mobilis</i>
β _1492_R	NR_157728	99,747	<i>Bacillus paranthracis</i>
β _1492_R	NR_074540	99,747	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
β _1492_R	NR_121761	99,747	<i>Bacillus toyonensis</i>
β _1492_R	NR_115714	99,747	<i>Bacillus cereus</i>
β _1492_R	NR_112630	99,747	<i>Bacillus cereus</i>
β _1492_R	NR_114582	99,747	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
β _1492_R	NR_114581	99,747	<i>Bacillus thuringiensis</i>
β _1492_R	NR_112780	99,747	<i>Bacillus thuringiensis</i>
β _1492_R	NR_113266	99,747	<i>Bacillus cereus</i>
<hr/>			
λ _27_F	NR_113166	98,525	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>
λ _1492_R	NR_145635	99,324	<i>Lysinibacillus cresolivorans</i>
λ _1492_R	NR_114207	99,324	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>
λ _1492_R	NR_114920	99,324	<i>Lysinibacillus macroides</i>
λ _1492_R	NR_041276	99,324	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>
λ _1492_R	NR_113166	99,211	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i>
λ _1492_R	NR_116698	99,655	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>
<hr/>			
ζ _27_F	NR_152692	99,118	<i>Bacillus wiedmannii</i>
ζ _27_F	NR_157735	99,118	<i>Bacillus proteolyticus</i>
ζ _27_F	NR_170494	99,118	<i>Bacillus fungorum</i>
ζ _27_F	NR_115526	98,824	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _27_F	NR_157736	98,824	<i>Bacillus tropicus</i>

ζ _{27_F}	NR_157734	98,824	<i>Bacillus paramycooides</i>
ζ _{27_F}	NR_157732	98,824	<i>Bacillus nitratireducens</i>
ζ _{27_F}	NR_157730	98,824	<i>Bacillus luti</i>
ζ _{27_F}	NR_157729	98,824	<i>Bacillus albus</i>
ζ _{27_F}	NR_074540	98,824	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
ζ _{27_F}	NR_115714	98,824	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{27_F}	NR_112630	98,824	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{27_F}	NR_114582	98,824	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
ζ _{27_F}	NR_113266	98,824	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{1492_R}	NR_148248	99,102	<i>Bacillus bingmayongensis</i>
ζ _{1492_R}	NR_115526	99,692	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{1492_R}	NR_043403	99,692	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ζ _{1492_R}	NR_152692	99,692	<i>Bacillus wiedmannii</i>
ζ _{1492_R}	NR_157736	99,692	<i>Bacillus tropicus</i>
ζ _{1492_R}	NR_157735	99,692	<i>Bacillus proteolyticus</i>
ζ _{1492_R}	NR_157733	99,692	<i>Bacillus pacificus</i>
ζ _{1492_R}	NR_157732	99,692	<i>Bacillus nitratireducens</i>
ζ _{1492_R}	NR_157731	99,692	<i>Bacillus mobilis</i>
ζ _{1492_R}	NR_157730	99,692	<i>Bacillus luti</i>
ζ _{1492_R}	NR_157729	99,692	<i>Bacillus albus</i>
ζ _{1492_R}	NR_157728	99,692	<i>Bacillus paranthracis</i>
ζ _{1492_R}	NR_036880	99,692	<i>Bacillus mycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_024697	99,692	<i>Bacillus mycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_113996	99,692	<i>Bacillus mycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_113991	99,692	<i>Bacillus pseudomycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_113990	99,692	<i>Bacillus mycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_074540	99,692	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
ζ _{1492_R}	NR_121761	99,692	<i>Bacillus toyonensis</i>
ζ _{1492_R}	NR_115714	99,692	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{1492_R}	NR_112630	99,692	<i>Bacillus cereus</i>
ζ _{1492_R}	NR_115993	99,692	<i>Bacillus mycooides</i>
ζ _{1492_R}	NR_114582	99,692	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
ζ _{1492_R}	NR_114581	99,692	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ζ _{1492_R}	NR_112780	99,692	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ζ _{1492_R}	NR_113266	99,692	<i>Bacillus cereus</i>

Los tres aislados presentaron muy alta identidad con secuencias de la base datos de los géneros esperados según los datos de la secuenciación por *metabarcoding* (Capítulo 3, sección 3.3.7). El aislado λ (números de acceso en GenBank: ON524732, ON524733) pertenecería al género *Lysinibacillus* y, posiblemente, a la especie *L. pakistanensis*, ya que fue el único taxón que tuvo buena identidad tanto para la lectura F como la R de la secuencia del aislado. El aislado β (ON521271, ON521272) sería una especie de *Bacillus*, potencialmente

B. Wiedmannii o *B. Proteolyticus* (ambas especies con identidad de 100% para la lectura F y 99,747% para la lectura R). Finalmente, el aislado ζ (ON528586 y ON528585) también pertenecería al género *Bacillus*. A diferencia del aislado β , el aislado ζ presentó una mayor cantidad de secuencias similares, aunque fueron las mismas especies (*B. Wiedmannii* y *B. Proteolyticus*) las que presentaron mayor identidad entre las lecturas F y R (ambas especies con 99,118% para la lectura F y 99,692% para la lectura R).

Como se mencionó en el capítulo anterior (**Capítulo 3, sección 3.4**), los microorganismos del género *Bacillus* han sido aislados en suelos de todo tipo, y son capaces de formar esporas, lo que les permite sobrevivir en condiciones extremas, incluyendo altas temperaturas (Nicholson *et al.*, 2000; Sakil Munna *et al.*, 2015). Algunas especies de este género, particularmente *B. subtilis* y *B. cereus*, han sido estudiados por su capacidad de sorber metales a través de la producción de biopolímeros extracelulares (Zeng *et al.*, 2020; Al Azad *et al.*, 2020).

Con relación al aislamiento de microorganismos anaerobios, no se logró obtener una población pura de microorganismos sulfato-reductores provenientes del consorcio SAnCo, aunque sí se obtuvo crecimiento positivo en los diferentes cultivos. Vale destacar que, si bien el consorcio estuvo dominado por el ASV 18 (*Desulfovibrio* sp.), éste representaba un 25% del total del consorcio, mientras que otros dos ASVs vinculados al mismo género sulfato-reductor (ASV 30 y ASV 87) representaban 11% de la abundancia total. En consecuencia, es posible que fuera necesario una mayor cantidad de etapas de selección de colonias y enriquecimiento en medio líquido para aislar los microorganismos de metabolismo similar. Dado que la evaluación de las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos con este metabolismo se realizaría sobre el consorcio (justificado en la mayor versatilidad y robustez que ofrecería) y que el aislamiento de especies particulares constituía un objetivo secundario de este trabajo de tesis (considerando el tiempo disponible), no se realizaron más esfuerzos por alcanzar poblaciones puras.

Respecto a los microorganismos celulolíticos, no se observó degradación de la celulosa en ninguno de los dos medios de cultivo probados. El género *Cellulomonas* representaba 30% de ambos consorcios (SAaZn y SAaNi), por lo que es posible que los medios utilizados no hayan sido los apropiados para el desarrollo de los microorganismos presentes y diferentes composiciones ameritarían ser evaluadas. Sin embargo, tal y como se mencionó sobre los aislamientos sulfato-reductores, en consideración del tiempo disponible para la realización de este trabajo de tesis y de los objetivos finales, no se procedió a avanzar en este sentido.

4.5. Procesos de biorremediación: biosorción de cadmio y zinc con células enteras

4.5.1. Introducción. Materiales y métodos

Las biomasas de los aislados β y ζ fueron sometidas a ensayos para determinar su capacidad de sorción del metal al que mostraron resistencia. El aislado λ no se utilizó porque el consorcio SAoCo no había exhibido ninguna variación en la concentración de metal soluble en los ensayos previos.

Se centrifugaron 20 mL de cada cultivo previamente crecido en medio LB en ausencia del metal, a 8000 g durante 15 minutos; el sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado tres veces con agua destilada. Luego, el pellet fue secado a 50°C en estufa durante 4 h y pesado en balanza analítica.

Una mezcla conteniendo 1 g/L de células y 20 mg/L de Cd(II) o Zn(II) fue preparada en erlenmeyers (50 mL de volumen final) con agua acidulada (pH 6) como solvente. El ensayo se realizó por triplicado en presencia de controles en los que no se agregó biomasa. Las muestras se incubaron a 25°C y 100 rpm de agitación tomándose muestras a diferentes tiempos (0, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h). En cada muestreo, se midió el valor de pH y se tomó un volumen que fue centrifugado a 12 000 g durante 10 minutos; el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0,22 μm de tamaño de poro y se diluyó apropiadamente en solución 0,14 M de HNO₃ para determinación posterior del catión metálico en un equipo de espectrofotometría de absorción atómica.

Al cabo de las 24 h, 15 mL de la mezcla restante fueron centrifugados a 8000 g durante 15 minutos para recuperar la biomasa. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado tres veces con agua (pH 6) para eliminar restos de solución con metal. Luego del último lavado, el pellet fue resuspendido en solución 0,1 M de H₂SO₄ y la suspensión incubada a 25°C durante 6 h en agitación de 120 rpm para solubilizar los cationes metálicos sorbidos sobre la superficie de la biomasa. Al cabo de ese tiempo, se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos, se filtró a través de una membrana de 0,22 μm de tamaño de poro y luego se

resuspendió en solución 0,14 M de HNO_3 para finalmente medir la concentración de metal adsorbido y recuperado.

El pellet previo fue lavado con agua destilada pH 6 dos veces y secado en estufa durante 4 h a 50°C . Se determinó el peso de la biomasa recuperada y se resuspendió en volumen adecuado (aproximadamente 15 mL) para hacer una nueva solución de 1 g/L de biomasa en agua pH 6 con 20 mg/L del metal correspondiente (similar a la primera parte del ensayo). La mezcla fue incubada a 25°C en agitación durante 24 h. En este caso, sólo se tomaron muestras al tiempo 0 y a las 24 h. Se midió pH y el sobrenadante de la muestra centrifugada y filtrada se diluyó en solución 0,14 M de HNO_3 para evaluar la capacidad de adsorción de la biomasa recuperada.

4.5.1. Resultados

La **Figura 4.6** muestra la cinética de sorción para ambos metales utilizando 1 g/L de biomasa inactiva frente a 20 mg/L de metal en agua acidulada (pH 6). La concentración de metal en los controles abióticos se mantuvo constante en el orden del metal agregado (20 mg/L) a lo largo de toda la experiencia y se consideró como el 100% de metal soluble o 0% de sorción.

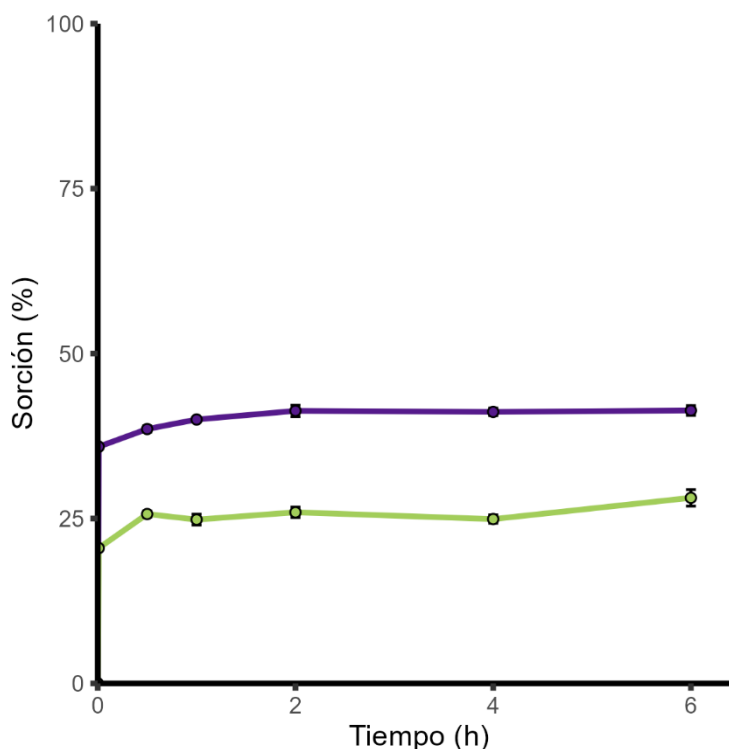


Figura 4.6– Porcentaje de metal sorbido. En violeta se representa la concentración de cadmio en la experiencia realizada con el aislado β y en verde la concentración de zinc en la experiencia realizada con el aislado ζ .

En ambos casos se observó una rápida sorción del metal agregado, alcanzando el equilibrio en menos de 1 hora de exposición. El aislado β (línea violeta) mostró la mayor sorción (40% de cadmio) mientras que el aislado ζ presentó una sorción menor (25% de zinc, línea verde). En ninguno de los dos casos se observó variación del pH, manteniéndose un valor de 6,5.

Las capacidades de sorción experimentales (q_e) obtenidas fueron 9 mg/g para cadmio utilizando el aislado β y 6 mg/g para zinc utilizando ζ . Estos valores se encuentran dentro del rango reportado en bibliografía para la biosorción de estos metales utilizando biomazas (vivas o muertas), aunque por debajo de la media de los datos. La **Tabla 4.4** muestra un relevamiento bibliográfico realizado con fines comparativos. Debe tenerse en cuenta que los valores referenciados en la **Tabla 4.4** representan capacidades de sorción máxima obtenidas tras la construcción de isotermas de sorción ajustadas a modelos teóricos (mayormente, los modelos de Langmuir y Freundlich), mientras que las sorciones obtenidas en este trabajo de tesis son experimentales y refieren a un único ensayo en una condición específica. La evaluación adecuada de la capacidad de sorción implicaría la realización de isotermas de sorción y la optimización de las condiciones de pH, temperatura y agitación (entre otras posibles variables). No obstante, el objetivo de este trabajo era sólo una primera aproximación hacia las posibles aplicaciones en la biorremediación de estos metales y no incluía un estudio exhaustivo del fenómeno de biosorción utilizando las biomazas de los aislados.

Tabla 4.4 – Recopilación bibliográfica de capacidades de sorción máxima reportadas para cadmio y zinc por diferentes bacterias

Metal	Organismo	q _{Max} (mg/g)	Ref.
Cd	<i>Bacillus subtilis</i>	101	Brierley <i>et al.</i> , 1986
Cd	<i>Pseudomonas</i> sp.	63	Xu <i>et al.</i> , 2020
Cd	<i>Bacillus thuringiensis</i>	59	Oves <i>et al.</i> , 2013
Cd	<i>Bacillus jeotgali</i>	54	Green-Ruiz <i>et al.</i> , 2008
Cd	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	53	Le & Yang, 2019
Cd	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	50	Le & Yang, 2019
Cd	<i>Brevundimonas</i> sp.	49	Mesoudzadeh <i>et al.</i> , 2011
Cd	<i>Enterobacter</i> sp.	46	Lu <i>et al.</i> , 2006
Cd	<i>Pectobacterium</i> sp.	45	Liu <i>et al.</i> , 2018
Cd	<i>Bacillus megaterium</i>	40	Sati <i>et al.</i> , 2014
Cd	<i>Geobacillus</i> sp.	38	Ozdemir <i>et al.</i> , 2009
Cd	<i>Bacillus cereus</i>	32	Huang <i>et al.</i> , 2013
Cd	<i>Bacillus cereus</i>	24	Huang <i>et al.</i> , 2013
Cd	Bacteria Gram-positiva	19	Gourdon <i>et al.</i> , 1990
Cd	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	Limcharoensuk <i>et al.</i> , 2015
Cd	Bacteria Gram-negativa	14	Gourdon <i>et al.</i> , 1990
Cd	<i>Pseudomonas putida</i>	8	Pardo <i>et al.</i> , 2003
Zn	<i>Bacillus subtilis</i>	137	Brierley k, 1986
Zn	<i>Bacillus jeotgali</i>	128	Green-Ruiz <i>et al.</i> , 2008
Zn	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83	Joo <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	76	Li <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	68	Li <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Bacillus cereus</i>	67	Joo <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	54	Li <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Streptomyces</i> K11	49	Sedlakova-Kadukova <i>et al.</i> , 2019
Zn	<i>Klebsiella</i> sp.	48	Muñoz <i>et al.</i> , 2018
Zn	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	43	Li <i>et al.</i> , 2010
Zn	<i>Acinetobacter</i> sp.	36	Tabaraki <i>et al.</i> , 2013
Zn	<i>Pectobacterium</i> sp.	34	Liu <i>et al.</i> , 2018
Zn	<i>Streptomyces rimosus</i>	30	Mameri <i>et al.</i> , 1999
Zn	<i>Geobacillus</i> sp.	29	Ozdemir <i>et al.</i> , 2009
Zn	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	17	Limcharoensuk <i>et al.</i> , 2015
Zn	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	14	Veneu <i>et al.</i> , 2013
Zn	<i>Penicillium digitatum</i>	10	Galun <i>et al.</i> , 1987
Zn	<i>Pseudomonas putida</i>	7	Pardo <i>et al.</i> , 2003
Zn	<i>Aspergillus niger</i>	5	Filipović-Kovačević <i>et al.</i> , 2000
-	Bacteria (promedio)*	98	Fathollahi <i>et al.</i> , 2020

*A partir de un meta-análisis de las biosorciones reportadas para varios metales por diferentes filos de bacterias

La biomasa recuperada del ensayo fue lavada con agua y tratada con ácido sulfúrico (0,1 M) durante 6 h para recuperar el metal sorbido. De esta manera se logró recuperar 82% del cadmio sorbido y 94% del zinc. Esto sugiere que el proceso es reversible y que el mecanismo predominante es de intercambio iónico; la sorción de los iones metálicos se produce por reemplazo de protones a pH por encima del pKa de los grupos predominantes en la biomasa mientras que, cuando el pH está por debajo del pKa, son los protones los que quedan sorbidos fuertemente sobre la biomasa. Estudios de espectroscopía FTIR (infrarroja por transformada de Fourier) sobre la superficie de bacterias del género *Bacillus* han demostrado que los grupos funcionales predominantes en estos organismos son amino, carbonilo, hidroxilo y carboxilo, que estarían involucrados en la interacción con los cationes metálicos y explicarían este mecanismo (Pan *et al.*, 2006 y 2007; Joo *et al.*, 2010; Oves *et al.*, 2013; Priyadarshane & Dan, 2021). Por otro lado, Camacho-Chab *et al.* (2018) determinaron cambios en la estructura de los exopolisacáridos de una cepa de *Bacillus* sp. tras la interacción con cadmio y sugirieron un mecanismo de complejación en el que intervenían los grupos amino.

La biomasa recuperada fue usada nuevamente en un ensayo de biosorción similar al inicial (1 g/L de biomasa frente a 20 mg/L de metal en agua acidulada de pH igual a 6). En este caso se observó un rendimiento menor: la sorción de cadmio sólo fue del 16% (frente al 40% exhibido en el primer ensayo) y del 7% en el caso del zinc (frente al 25% del primer ensayo). La pérdida significativa de la sorción de la biomasa seguramente está vinculada con el efecto de la solución ácida utilizada durante la elución; un efecto similar fue reportado por Hammami *et al.* (2005) quienes registraron una pérdida parcial de capacidad de sorción en la elución de barros activados con EDTA y una pérdida total si la elución era realizada con HCl. Aunque lo usual es la pérdida progresiva de la capacidad de sorción, existen reportes que afirman lo contrario; por ejemplo, Ribeiro do Carmo *et al.* (2012) demostraron que la concentración de ácido y el tiempo de exposición utilizados no afectaban la viabilidad y la sorción sobre biombrasas de *Cladosporium*.

El efecto de la elución con ácido podría deberse a un daño físico sobre la biomasa que modifique el acceso o la interacción con la solución y, quizás, también a una saturación con protones que no son eficientemente desplazados por los iones metálicos en la segunda sorción (Zhou *et al.*, 1998). Del mismo modo que con el proceso de sorción, las condiciones de elución podrían optimizarse analizando tanto la concentración de ácido utilizada como el tiempo de exposición a fin de recuperar la mayor cantidad de metal ocasionando el menor daño a la estructura celular.

4.6. Procesos de biorremediación: biosorción de cadmio y zinc con exopolímeros

4.6.1. Introducción. Materiales y métodos

Debido a que las evidencias sugerían que los cultivos de los aislados ζ y β produjeron sorción a través de sus exopolímeros, se decidió realizar un ensayo de biosorción utilizando directamente este biomaterial. Para ello, se extrajeron los exopolímeros producidos (EPS) en cultivos de esos aislados en medio LB. La extracción se realizó utilizando una resina de intercambio catiónico (CER) (DOWX Marathon, Sigma, Estados Unidos). El procedimiento fue el siguiente: 50 mL de cada cultivo fueron fraccionados en dos tubos falcon y centrifugados a 5000 g durante 15 minutos. El pellet obtenido fue lavado dos veces con agua estéril (20 mL) para eliminar restos del medio de cultivo. La última centrifugación se realizó a 4000 g durante 20 minutos a 4°C. La biomasa obtenida fue pesada en balanza analítica (peso húmedo aproximado de 0,5 g en cada tubo falcon) y resuspendida en 20 mL de medio PBS estéril (Na_3PO_4 (2 mM), NaH_2PO_4 (4 mM), NaCl (9 mM) y KCl (1 mM), ajustado a pH 7). Por otro lado, la resina CER fue equilibrada en medio PBS en una relación de 5 g de resina por cada 20 mL de medio PBS. La biomasa suspendida en PBS fue transvasada a un recipiente que contenía la resina equilibrada en PBS, en una relación biomasa-resina de 1 a 10. La mezcla fue incubada a 4°C en 100 rpm de agitación *overnight*. Luego, se centrifugó a 4000 g durante 1 minuto. El sobrenadante se trasvasó a un nuevo falcón. El pellet, conteniendo la resina, fue lavado con 20 mL de PBS y centrifugado nuevamente para mejorar la recuperación de EPS. 10 mL del sobrenadante fueron agregados al mismo tubo alcanzando un volumen final de 30 mL. El tubo falcon fue centrifugado a 4000 g 15 minutos a 4°C para eliminar pequeños restos de resina que pudieran quedar. Posteriormente se dializó el sobrenadante en bolsas de 2 KDa de *cutoff* en 1 L de agua ultrapura durante 24 h (el agua fue renovada a las 12 h) a temperatura ambiente. De cada bolsa de diálisis se tomaron 10 mL que se depositaron en placas de vidrio (previamente

pesadas); esas placas fueron secadas a 105°C antes de determinar la masa total del material extraído. El volumen restante (aproximadamente 20 mL) fue fraccionado en dos tubos falcon de 15 mL que posteriormente fueron liofilizados. Se determinó la masa del material liofilizado y se almacenó a -20°C.

Los exopolímeros obtenidos fueron utilizados en un ensayo para evaluar la cinética de sorción. Los EPS liofilizados de cada aislado (β y ζ) fueron agregados a soluciones 100 mg/L de Cd(II) o Zn(II) en agua acidulada (pH 6); la concentración de EPS en la solución final fue de 1 g/L. Se utilizó cadmio para la sorción con EPS provenientes de la muestra β y zinc para la sorción con EPS provenientes de la muestra ζ . Se prepararon controles consistentes en sistemas similares, pero sin agregado de EPS. El ensayo fue realizado por triplicado.

Los sistemas fueron incubados a 25°C en 100 rpm de agitación tomándose muestras a diferentes tiempos: 0, 1, 2, 4, 6 y 24 h. En las muestras se determinó el pH, posteriormente se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se diluyó en solución 0,14 M de HNO₃ para la determinación de Cd o Zn, según correspondiera, utilizando espectroscopía de absorción atómica.

Para construir las isotermas de sorción, se realizó un ensayo similar utilizando soluciones 100 mg/L de Cd(II) o Zn(II) pero con diferentes concentraciones de EPS: 0,1, 0,5 y 0,8 g/L. Los controles utilizados fueron similares, pero sin agregado de EPS. El ensayo se realizó por triplicado. Los sistemas fueron incubados a 25°C en agitación de 100 rpm. Se tomaron muestras inicialmente y al cabo de 1 hora cuando se estimó alcanzado el equilibrio en base a la cinética. En cada muestra se determinó el pH; posteriormente, la muestra se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se diluyó en solución 0,14 M de HNO₃ para la determinación de Cd o Zn, según correspondiera, por espectrofotometría de absorción atómica.

Las isotermas de biosorción fueron analizadas a través del modelo de Langmuir (ec. 4.9), basado en sorción homogénea sobre una monocapa, y del modelo de Freundlich (ec. 4.10), en donde se supone heterogeneidad en la superficie donde se produce la sorción.

$$q_e = \frac{q_{Max} b C_e}{1 + b C_e} \quad (4.9)$$

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (4.10)$$

donde q_e es la masa adsorbida por masa de biosorbente en equilibrio (llamada *capacidad de sorción*), q_{max} es la capacidad máxima de sorción, C_e es la concentración de sorbato en equilibrio (en este caso, metal soluble), b es una constante relacionada a la afinidad sorbato-sorbente (a veces denominada K_L), K_f es una constante relacionada a la capacidad de sorción y n es una constante relacionada a la intensidad de sorción.

Las isothermas obtenidas fueron evaluadas a través de ecuaciones linealizadas de estos modelos. La linealización del modelo de Langmuir conduce a la **ec. 4.11**. El gráfico C_e/q_e vs. C_e debería dar una línea recta si la sorción se ajusta a este modelo; la pendiente permite determinar la capacidad de sorción máxima (q_{max}) y a partir de su ordenada al origen, es posible calcular la constante b .

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{Max} b} + \frac{C_e}{q_{Max}} \quad (4.11)$$

La linealización del modelo de Freundlich se expresa en la **ec. 4.12**. El ajuste a este modelo se visualiza como una línea recta en un gráfico $Ln(q_e)$ vs. $Ln(C_e)$; con el valor de la pendiente puede determinarse la constante n y con su ordenada al origen se puede calcular el valor de K_f .

$$Ln(q_e) = Ln(K_f) + \frac{1}{n} Ln(C_e) \quad (4.12)$$

Los valores de R^2 permitieron decidir cuál de los modelos se ajusta mejor a los datos experimentales.

4.6.2. Resultados

La **Tabla 4.5** muestra el rendimiento de la extracción y la concentración de EPS estimada por célula del microorganismo aislado.

Tabla 4.5 – Rendimiento de la extracción de EPS de los aislados

	EPS (g/mL)	Biomasa (cél/mL)	pg EPS/cél
B	0,0283	$1,10 \times 10^9$	1,29
Z	0,0221	$2,08 \times 10^9$	0,53

En la figura siguiente (4.7), se muestra la cinética de sorción utilizando 1 g/L de EPS frente a 100 mg/L de metal.

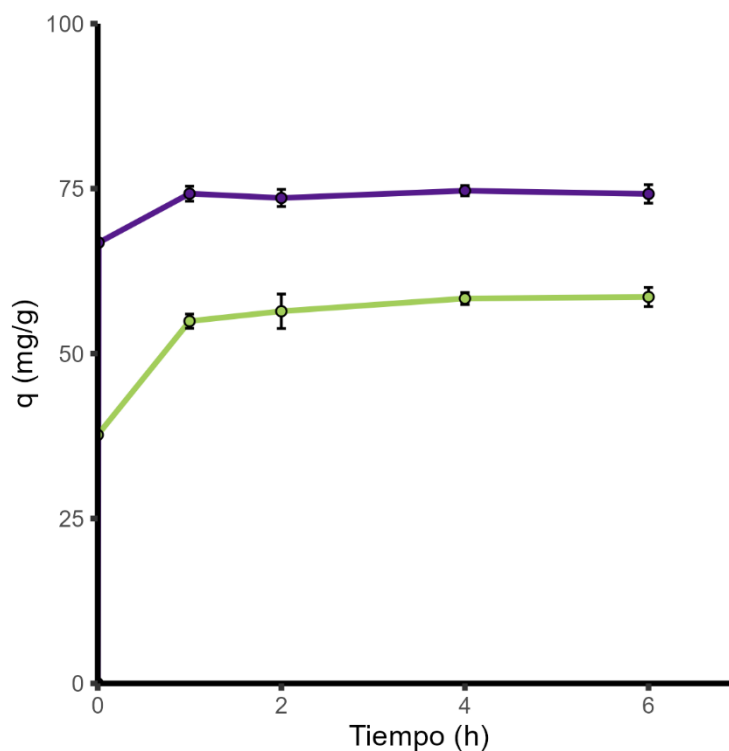


Figura 4.7 – Cinética de sorción de cadmio y zinc utilizando los EPS de β (violeta) y ζ (verde).

La sorción de metales sobre los exopolímeros fue muy rápida (inferior a la hora de exposición); en los controles sin agregado de EPS no hubo cambio aparente en la concentración de los metales en solución.

Al alcanzar el equilibrio se comprobó que 64% del cadmio había sido adsorbido sobre los EPS de β mientras que, en el caso del zinc, la sorción sobre los EPS de ζ llegó al 49%. Estos valores superan significativamente lo obtenido con las células enteras (40% y 25%, respectivamente). De igual manera, las capacidades de sorción experimental determinadas fueron 75 mg/g para el EPS de β y 59 mg/g para el EPS de ζ ; ambos valores son diez veces superiores a lo determinado durante la sorción con las células.

El incremento en la concentración de EPS mostró un incremento en el porcentaje de metal sorbido, pero, en el caso de β , significó una disminución la capacidad de sorción (qe) (**Figura 4.8**). La primera observación está directamente relacionada con el aumento en la cantidad de sitios activos para la interacción con los cationes metálicos: mayor cantidad de sitios activos permite mayor cantidad de metales sorbidos. Por el contrario, la disminución en la capacidad de sorción al aumentar la cantidad de sorbente es un fenómeno más complejo y menos definido, pero frecuentemente reportado. Una posible explicación es un apantallamiento causado por la interacción electrostática entre las moléculas de EPS, disminuyendo la cantidad efectiva de sitios activos libres (Priyadarshane & Das, 2021). Esta hipótesis puede sustentarse en la observación realizada por Espósito *et al.* (2001), quienes mostraron que la disminución de la capacidad de sorción puede revertirse al disminuir el pH, argumentando que la hidrólisis de los grupos funcionales en condiciones ácidas disminuye la interacción electrostática y, por lo tanto, el apantallamiento. Por otro lado, se ha propuesto una disminución del gradiente de difusión causado por la fuerza iónica y la concentración de iones metálicos en solución (Fourest & Roux, 1992; Veglió *et al.*, 1997; Salehizadeh & Shojaosadati, 2003).

La capacidad de biosorción de zinc utilizando el EPS de ζ no varió significativamente al aumentar la concentración de sorbente sugiriendo una relación lineal entre la cantidad de sitios de interacción del EPS y la cantidad de metal sorbido.

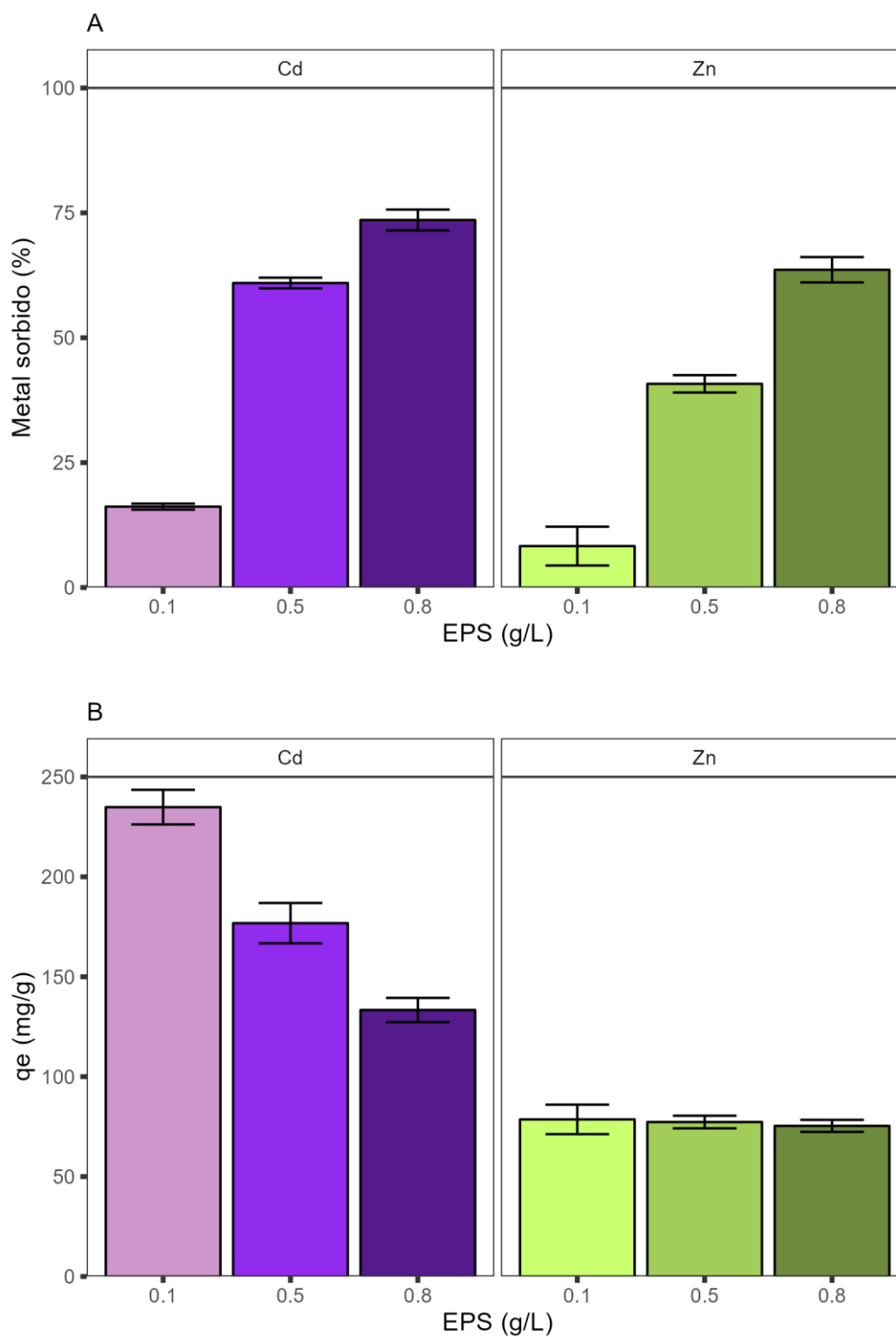


Figura 4.8 – Cantidad de metal sorbido (A) y capacidad de sorción (B) en función de la concentración de EPS.

Las remociones máximas, alcanzadas con la mayor concentración de EPS utilizada (0,8 g/L), fueron de 74% para el cadmio y de 64% para el zinc. Las capacidades de sorción determinadas experimentalmente para esa concentración

de sorbente, fueron 133 mg/g para el EPS de β y 75 mg/g para el EPS de ζ ; por otro lado, cuando la concentración de sorbente fue 0,1 g/L, las capacidades de sorción fueron más elevadas: 235 mg/g y 78 mg/g, para los EPS de β y ζ , respectivamente.

Con los valores obtenidos en el ensayo, se realizaron las isotermas de adsorción, las cuales fueron evaluadas a través de los modelos de Langmuir y Freundlich. En la **Tabla 4.6** se encuentran los coeficientes de regresión R^2 obtenidos para cada modelo observándose un mejor ajuste con el modelo de Langmuir. En la **Figura 4.9** se muestran las gráficas representando la forma linealizada de este modelo para ambas sorciones (con coeficientes de regresión R^2 de 0,97 para la sorción sobre los EPS de β y de 0,92 para ζ).

Tabla 4.6 – Evaluación del ajuste de las isotermas a modelos de sorción

Modelo	Ecuación lineal	R^2 (β)	R^2 (ζ)
Langmuir	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{max}b} + \frac{C_e}{q_{max}}$	0,97	0,92
Freundlich	$\ln(q_e) = \ln(K_f) + \frac{1}{n}\ln(C_e)$	0,93	0,01

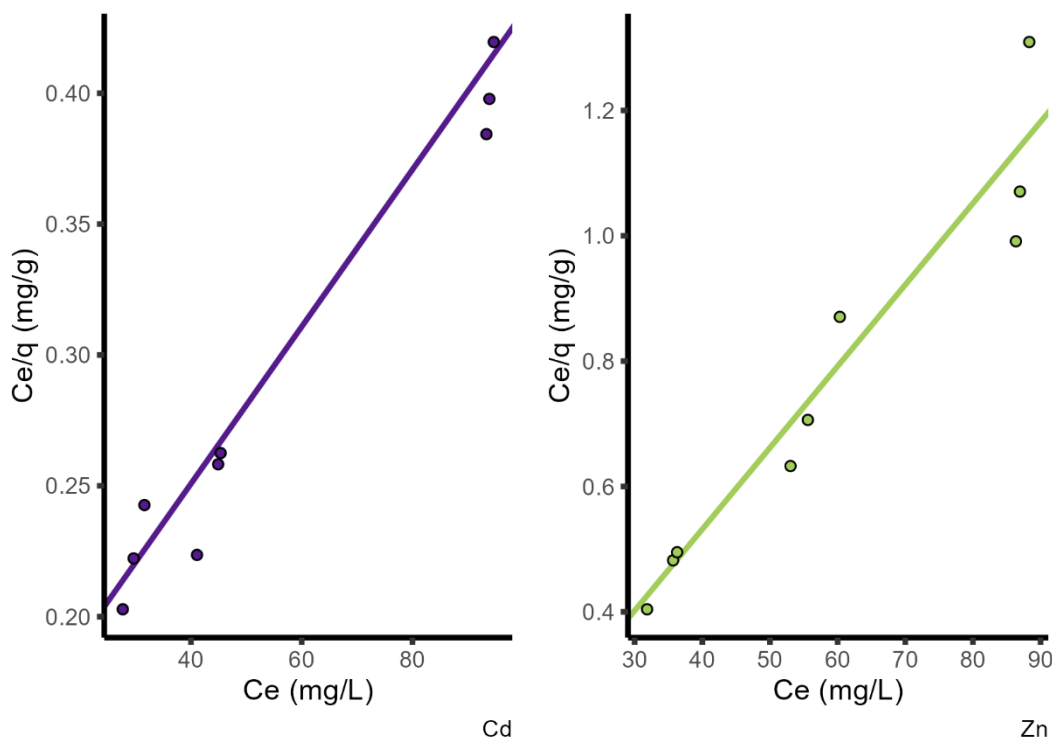


Figura 4.9 – Linealización de las isothermas de sorción de cadmio (violeta) y de zinc (verde) de acuerdo con el modelo de Langmuir.

A partir de la linealización del modelo, se calcularon los parámetros capacidad máxima de sorción (q_{max}) y la constante b (también llamada K_L) relacionada a la afinidad sorbente-sorbato. Las capacidades máximas obtenidas fueron 350 mg/g (3,11 mmoles/g) para la sorción de cadmio sobre los EPS de la muestra β y 78 mg/g (2,20 mmoles/g) de zinc sobre los EPS de la muestra ζ . Las afinidades fueron 0,02 L/mg y 1,09 L/mg para la sorción del cadmio y del zinc, respectivamente.

El modelo de Langmuir permite calcular el coeficiente de separación (R_L) (ecuación 4.13), el cual indica la naturaleza del proceso de sorción.

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_{inicial}} \quad (4.13)$$

Si R_L tiende a 0, el equilibrio de sorción es irreversible y el sorbato se encuentra fuertemente adherido al sorbente sin procesos de desplazamiento o desorción significativos; si R_L se encuentra entre 0 y 1, el equilibrio es favorable, pero existen procesos de desplazamiento o desorción; si $R=1$ el proceso es lineal

y no existe afinidad considerable entre sorbato y sorbente; y si R es mayor a 1 el equilibrio es desfavorable, prevaleciendo la desorción (Hall *et al.*, 1966; Hu *et al.*, 2018).

El factor de separación para la sorción con los EPS de β fue 0,30, indicando que el proceso de sorción de cadmio es favorable. Por su parte, el factor R_L para los EPS de ζ fue 0,01 sugiriendo una afinidad muy fuerte entre el zinc y estos EPS.

La **Tabla 4.7** muestra una recopilación bibliográfica de eficiencias (% de remoción) y capacidades de biosorciones (q_{Max}) utilizando polímeros de diferentes organismos. Los valores de q y las eficiencias de remoción obtenidas en este trabajo de tesis utilizando los EPS se encuentran dentro del rango reportado, incluso en relación a una resina comercial y a las máximas sorciones reportadas utilizando células (**Tabla 4.4**). Más aún, la capacidad de los EPS de β para sorber cadmio supera a muchos de los reportes bibliográficos. A pesar de ello, las eficiencias descritas para barros activados y para biopolímeros extraídos de aislados de la especie *Bacillus firmus* son considerablemente mayores tanto para zinc como para cadmio. De todas maneras, y tal como se mencionó respecto a las sorciones con células enteras, los valores aquí reportados responden a ensayos en una única condición de pH, temperatura y agitación (entre otras variables a considerar), representando sólo un primer acercamiento a las capacidades potenciales que podrían alcanzarse si se realiza una optimización del proceso.

Tabla 4.7 – Recopilación bibliográfica de eficiencias de biosorción utilizando biopolímeros

Organismo/Sorbente	Metal	q _{Max} (mg/g)	Rem. (%)	C _o (mg/L)	Ref.
<i>Enterobacter cloaceae</i>	Cd	-	65	100	Gupta & Diwan, 2017
<i>Gloeocapsa gelatinosa</i>	Pb	82	-	-	
<i>Calothrix marchica</i>	Pb	65	-	-	
<i>Cyanospira capsulate</i>	Cu	115	-	-	
<i>Nostoc PCC7936</i>	Cu	85	-	-	
<i>Pseudomonas putida</i>	Cd	-	80	10	
<i>Rhizobium. tropici</i>	Cd	-	80	10	
<i>Paenibacillus jamilae</i>	Cd	21	-	-	
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Cu	1602	-	-	
<i>Bacillus cereus</i>	Cr(VI)	-	90	50	
<i>Bacillus pumilus</i>	Cr(VI)	-	89	50	
<i>Bacillus firmus</i>	Pb	1103	98	-	
	Cu	860	75	-	
	Zn	722	62	-	
<i>Ensifer meliloti</i>	Pb	89	50	-	
	Ni	85	50	-	
	Zn	66	50	-	
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Cr(VI)	58	-	-	
	Cd	30	-	-	
	Cu	26	-	-	
<i>Chryseomonas luteola</i>	Cd	64	-	-	
	Co	55	-	-	
	Cu	126	-	-	
	Ni	72	-	-	
Consorcio Gram-negativo	Zn	4	77	-	
	Pb	4	79	-	
	Cr(VI)	4	74	-	
	Ni	3	67	-	
	Cu	4	71	-	
	Cd	4	73	-	
	Co	4	76	-	
Barrios activados	Cd	900	-	-	Liu <i>et al.</i> , 2001
	Co	1100	-	-	
	Cr(VI)	250	-	-	
	Cu	1120	-	-	
	Ni	250	-	-	
	Zn	1480	-	-	
Resina	Cd	146	-	-	Liu & Tang, 1999
	Zn	85	-	-	
Turba	Cd	22	-	-	Wase <i>et al.</i> , 1997
	Zn	10	-	-	

4.6.3. Conclusiones

Dos especies de *Bacillus* aisladas de los consorcios organótrofos de Salto del Agrio resistentes fueron capaces de disminuir la concentración de cadmio y de zinc en solución y evidenciaron potencial para ser utilizadas en procesos de biosorción.

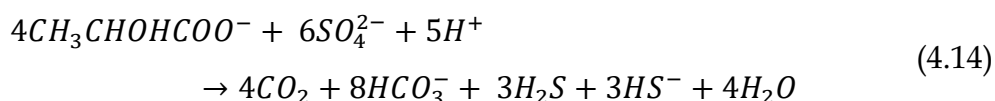
Los metales son adsorbidos sobre la superficie de las células de estos aislados, probablemente, a través mecanismos de intercambio iónico, y pueden ser eluidos y recuperados en casi su totalidad al ser tratados con soluciones ácidas diluidas. Sin embargo, este tratamiento aparenta condicionar la reutilización de las biomásas disminuyendo considerablemente la eficiencia de procesos de sorción posteriores. Una optimización del proceso de elución (tiempo de exposición, naturaleza y concentración del eluyente) sería necesaria para avanzar sobre esta posible aplicación de las biomásas.

La extracción y utilización directamente de los polímeros extracelulares de estas especies de *Bacillus* aisladas mostró una mayor eficiencia y capacidad de sorción para cadmio y zinc, incluso fueron superiores a muchos valores reportados en bibliografía. Estos resultados, obtenidos aún sin realizar un apropiado proceso de optimización, alientan a avanzar en el estudio de los exopolímeros de estas especies y de analizar diferentes condiciones para los procesos de biosorción, así como analizar su posible elución, con el fin de evaluar la potencialidad real de esta aplicación.

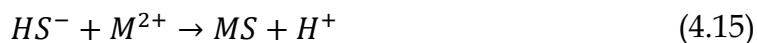
4.7. **Procesos de biorremediación: sulfidogénesis**

4.7.1. **Introducción. Materiales y métodos**

Los consorcios anaeróbicos sulfato-reductores, generadores de ion sulfuro, pueden ser utilizados biotecnológicamente para precipitar cationes metálicos que formen sulfuros poco solubles. Como se ha mencionado previamente, el sulfuro se genera como producto de la reducción del sulfato que estos microorganismos utilizan como aceptor final de electrones bajo condiciones anaeróbicas. Este metabolismo se esquematiza con la **ecuación 4.14** utilizando lactato como fuente de carbono.



Luego, el sulfuro soluble en esas condiciones (HS^-) puede reaccionar con los cationes metálicos (M) formando compuestos de muy baja solubilidad ($\text{pKps} > 20$) (ec. 4.15).



En función de analizar la factibilidad de ser utilizado en procesos de bioprecipitación, se realizó una cinética de consumo de sulfato (y en forma indirecta de generación de sulfuro) del consorcio anaeróbico SAnCo. Este consorcio fue escogido ya que estaba compuesto mayormente por microorganismos del género sulfato-reductor *Desulfovibrio*; además, había exhibido resistencia a grandes concentraciones de cobalto (~600 mg/L) y fue capaz de reducir considerablemente la concentración de este metal en solución.

Para esta experiencia, se prepararon 300 mL de medio PgF al que se le burbujó N_2 (libre de O_2) durante 15 minutos. Posteriormente, el medio fue fraccionado en viales de 12 mL agregando 9,5 mL de medio e inoculando luego al 5% con un cultivo crecido del consorcio SAnCo. Los viales se sellaron con virolas metálicas y fueron incubados a 30°C. Paralelamente, se prepararon 4 controles abióticos (sin inocular). Para cada tiempo, un grupo de triplicado de viales se discontinuaba y se destinaba a la determinación de la población celular

(por recuento al microscopio), pH y Eh. En el caso de los controles, sólo se hicieron determinaciones al inicio y al final de la experiencia.

También se tomaron muestras para la determinación de la concentración de sulfato. Esta se realizó según un protocolo diseñado como variación al método turbidimétrico con BaCl₂ (**Anexo I**). 1 mL de la muestra se puso en contacto con 1 mL de una solución patrón de BaCl₂ (3000 mg/L), produciéndose la precipitación de BaSO₄ (pK_{ps}~10). Luego de 1 hora, la mezcla se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos; el sobrenadante se diluyó 1:3 en solución 0,14 M de HNO₃. Finalmente, la concentración de Ba(II) remanente en la mezcla de reacción fue medida por espectrofotometría de absorción atómica.

El consumo de sulfato (un sustrato) (r_s) puede analizarse a partir de la ecuación de Pirt (**ecuación 4.16**), tal como desarrolló en el **Capítulo 2, 2.2.7**.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{xs}} + X_m \quad (4.16)$$

donde r_x es la velocidad de consumo de sulfato, Y_{xs} es el rendimiento para el crecimiento con dicho sustrato y el término X_m representa la fracción de la energía obtenido del sustrato utilizada para el mantenimiento celular.

El desarrollo y la integración de la ecuación de Pirt (**ecuación 4.17**) permite obtener la siguiente ecuación:

$$[SO_4^{2-}]_0 - [SO_4^{2-}] = \frac{X_0}{Y_{X/SO_4}} (e^{\mu t} - 1) \quad (4.17)$$

donde $[SO_4^{2-}]_0$ es la concentración de sulfato al tiempo inicial, $[SO_4^{2-}]$ la concentración a un tiempo t , X_0 es la concentración de células al tiempo inicial, Y_{X/SO_4} es el rendimiento en células del sulfato y μ la velocidad específica de crecimiento (que puede aproximarse a la velocidad máxima μ_{Max}).

A partir de la concentración de sulfato y de la población celular, ambas determinadas experimentalmente, y de la velocidad de crecimiento (determinada a partir de la variación de la concentración de células a lo largo del tiempo), se ajustó el consumo de sulfato a la **ecuación 4.17** para estimar el rendimiento

(Y_{X/SO_4}). El ajuste se realizó iterativamente utilizando el paquete nls en R (Baty *et al.*, 2015).

En los cálculos se consideró que todo el sulfato consumido había sido reducido y transformado en alguna de las especies estables de sulfuro. Por lo tanto, es posible escribir el balance de masas siguiente (**ec. 4.18**):

$$[SO_4^{2-}]_{inicial} - [SO_4^{2-}]_{final} = [S_{Total}] = [S^{2-}] + [HS^-] + [H_2S] \quad (4.18)$$

El equilibrio de las especies de sulfuro en solución está determinado, en función del pH, a partir de las constantes de disociación ácida, K_{a1} (**ec. 4.19**) y K_{a2} (**4.20**).

$$K_{a1} = \frac{[HS^-][H^+]}{[H_2S]} = 1 \times 10^{-7} \quad (4.19)$$

$$K_{a2} = \frac{[S^{2-}][H^+]}{[HS^-]} = 1 \times 10^{-14} \quad (4.20)$$

La especie H_2S es gaseosa a temperatura ambiente, por lo que su concentración en solución estará en equilibrio con su presión de vapor en la atmósfera del sistema. Este equilibrio puede describirse según la Ley de Henry (**ec. 4.21**):

$$K_H = \frac{[H_2S]_{sn}}{p_{H_2S}} = 0,1 \text{ M/atm} \quad (4.21)$$

Considerando los objetivos de este trabajo, es adecuado aproximar el comportamiento del gas H_2S al de un gas ideal; así, su presión de vapor puede aproximarse según la **ecuación 4.22**:

$$p_{H_2S} = \frac{n}{V_g} RT = [H_2S]_g RT \quad (4.22)$$

donde n es el número de moles de gas en una atmósfera de volumen V_g , R es la constante general de los gases y T la temperatura del sistema.

Por lo tanto, el balance de masas (**ec. 4.18**) puede reescribirse distinguiendo los moles de sulfuro de hidrógeno que se encuentran solubles ($H_2S_{(sn)}$) y los moles en la atmósfera del sistema ($H_2S_{(g)}$) (**ec. 4.23**):

$$[SO_4^{2-}]_i - [SO_4^{2-}]_f = [S_T] = [S^{2-}] + [HS^-] + [H_2S]_g + [H_2S]_{sn} \quad (4.23)$$

A partir de las ecuaciones anteriores, es posible reescribir el balance de masas únicamente en función del número de moles de H₂S en solución (**ec. 4.24**):

$$[S_T] = [H_2S]_{(sn)} \left[\left(\frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} \right) + \left(\frac{K_{a1}}{[H^+]} \right) + \left(\frac{V_g}{V_L RT K_H} \right) + 1 \right] \quad (4.24)$$

donde V_g es el volumen de gas disponible en el sistema y V_L el volumen de solución.

De esta manera, a partir de una cantidad de moles de azufre total – dada por el consumo de sulfato determinado experimentalmente –, es posible calcular el número de moles de cada especie de sulfuro en función del pH y la temperatura del sistema (**ecuaciones 4.25-4.28**).

$$[H_2S]_{(sn)} = \frac{[S_T]}{\left[\left(\frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} \right) + \left(\frac{K_{a1}}{[H^+]} \right) + \left(\frac{V_g}{V_L RT K_H} \right) + 1 \right]} \quad (4.25)$$

$$[S^{2-}] = [H_2S]_{sn} \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} \quad (4.26)$$

$$[HS^-] = [H_2S]_{(sn)} \frac{K_{a1}}{[H^+]} \quad (4.27)$$

$$[H_2S]_{(g)} = [H_2S]_{(sn)} \frac{V_g}{V_L RT K_H} \quad (4.28)$$

4.7.1. Resultados

La **Figura 4.10** muestra el incremento en la población celular en suspensión a lo largo del tiempo de la experiencia. La fase estacionaria se alcanzó luego de 336 h (14 días) y la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{Max}) fue $0,0078\text{ h}^{-1}$. Con este último valor se obtuvo un tiempo de duplicación de 89 h.

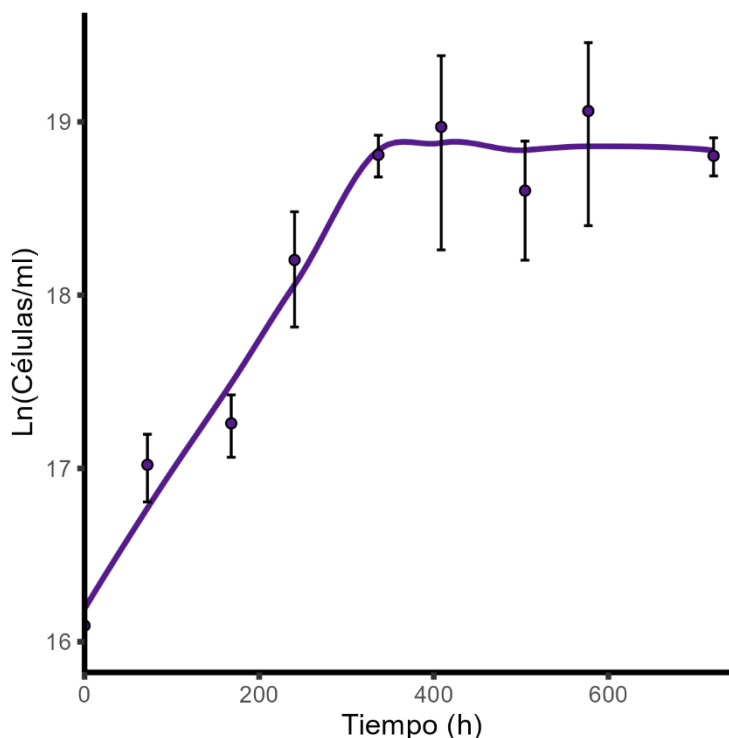


Figura 4.10 – Logaritmo natural de la variación de la concentración de células en suspensión.

En este sistema, la variación del potencial redox (Eh) indica la desaparición de las especies oxidadas (principalmente, sulfato) y el aumento en la concentración de las especies reducidas (principalmente, las especies de sulfuro). De ese modo, a medida que se desarrolla el metabolismo sulfato-reductor, el Eh disminuye hacia potenciales cada vez más negativos. En la figura se observa el descenso del potencial redox hasta 17 días (408 h) que luego se mantiene constante en el rango de -350 mV ; esa meseta coincide con la fase estacionaria que se observa en la población celular en suspensión. El aumento inicial del

potencial redox, puede deberse a la disolución del oxígeno que ingresa al sistema al manipular los viales para su inoculación y toma de muestra.

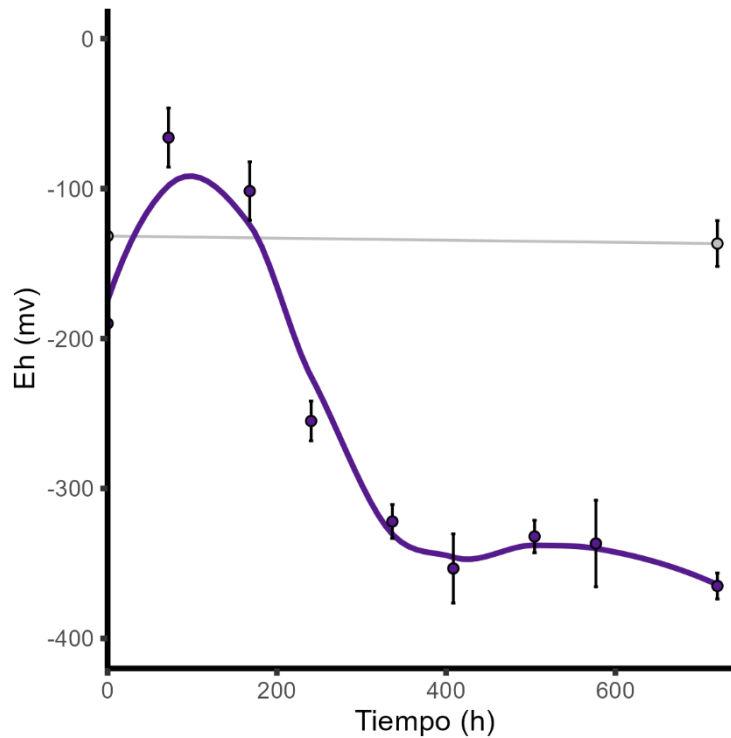


Figura 4.11 – Variación del potencial redox (Eh) (mV) en los cultivos (violeta) y los sistemas control, sin inocular (gris).

En la **Figura 4.12** se representa la concentración de sulfato soluble. El medio utilizado (PgF) tiene una concentración de 1000 mg/L y esta concentración no se modifica en los controles abióticos. El consorcio, en cambio, disminuyó la concentración de sulfato soluble de manera sostenida, incluso cuando tanto la biomasa como el potencial redox habían alcanzado la estabilidad.

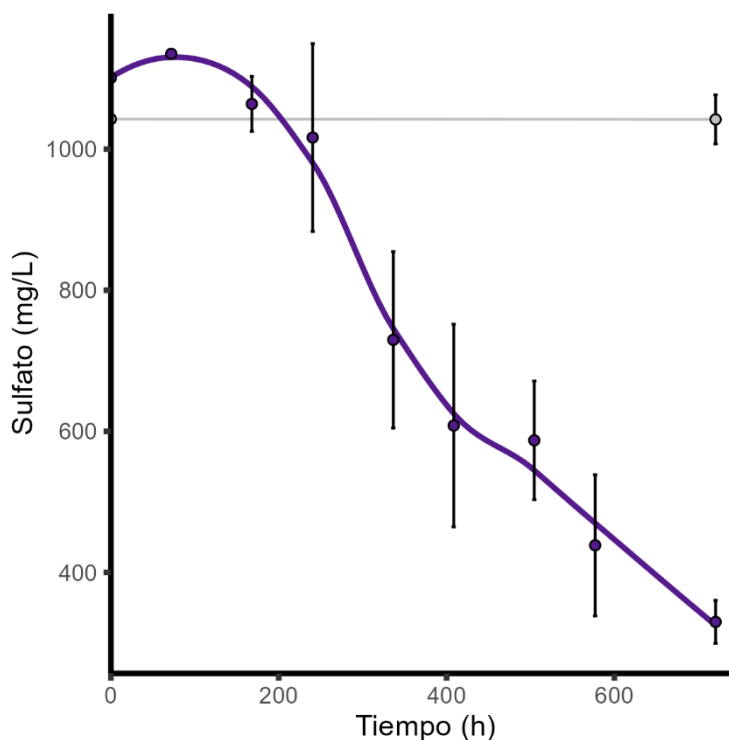


Figura 4.12 – Concentración de sulfato en los cultivos (violeta) y en los sistemas control (gris).

La cinética de consumo de sulfato fue ajustada a un modelo de crecimiento para estimar su rendimiento (Y_{X/SO_4}) en el crecimiento del consorcio. En la **Figura 4.13** se ha representado el consumo de sustrato, allí resulta claro que su velocidad se modifica significativamente a partir de las 408 h, sugiriendo la limitación por otro sustrato (fuente de carbono, nitrógeno o fósforo). Utilizando el valor de la población celular al tiempo inicial ($9,75 \times 10^9$ cél/L) y la velocidad de crecimiento máxima determinada previamente ($0,0078 \text{ h}^{-1}$) se modeló la curva en la fase de crecimiento exponencial tal cual se muestra en la figura. Para ello, se tomó como valor de referencia para el proceso iterativo el rendimiento reportado por Brandis & Thauer (1981) ($Y_{X/SO_4} = 10 \text{ g/mol}_{SO_4}$) considerando una masa aproximada de $5 \times 10^{-14} \text{ g/célula}$ para una célula bacteriana (Loferer-Kroißbacher *et al.*, 1998), es decir, el valor de referencia se estimó como $2,00 \times 10^{14} \text{ cél/mol}_{SO_4}$. El rendimiento obtenido de esta manera para el consorcio SAnCo fue $4,49 \times 10^{13} \text{ cél/mol}_{SO_4}$ ($2,25 \text{ g/mol}_{SO_4}$).

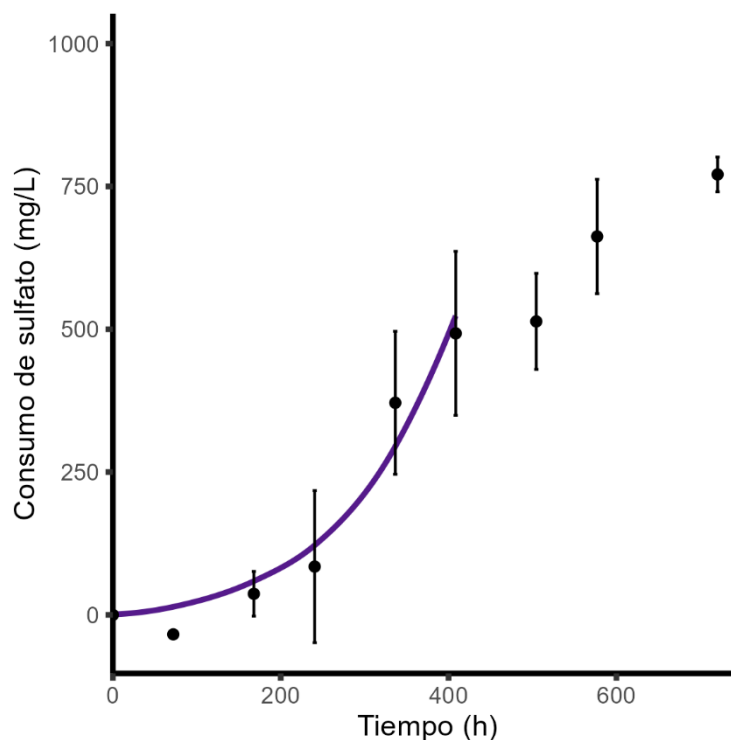


Figura 4.13 – Modelado del consumo de sulfato en los cultivos. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la curva (violeta) es el ajuste al modelo teórico.

Considerando que todo el sulfato consumido había sido reducido a alguna de las especies estables (H_2S , HS^- , S^{2-}), se estimó la concentración de estas especies a partir de los equilibrios químicos de disociación ácida. Estos equilibrios dependen del pH por lo que la variación en la acidez del medio debe ser considerada; la misma reducción de sulfato consume protones alcalinizando el medio. Este fenómeno se observó principalmente en los tiempos finales de la incubación (**Figura 4.14**), en los cuales el pH se elevó hasta valores cercanos a 8.

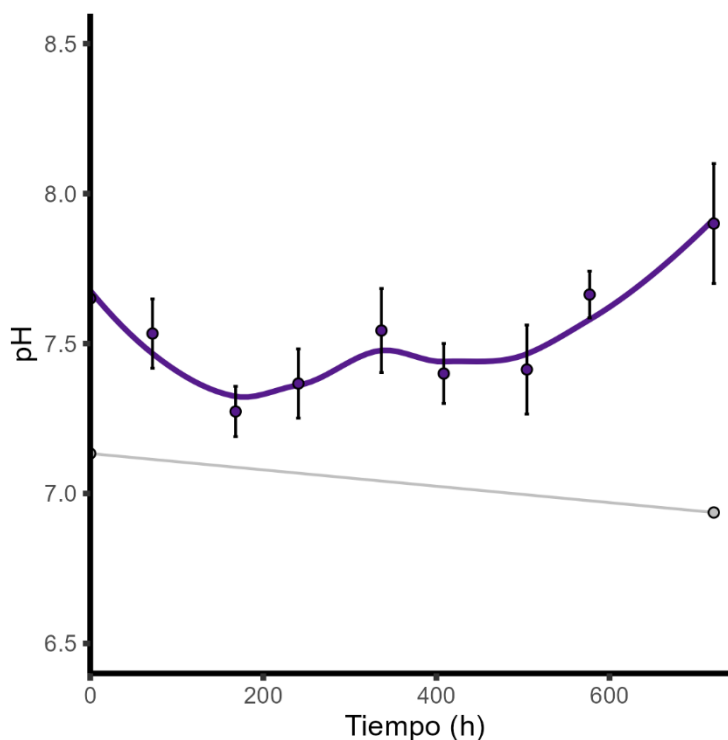


Figura 4.14 – Variación del pH en los cultivos (violeta) y los controles abióticos (gris).

La especie HS^- fue la predominante en el sistema ($\sim 75\%$ del sulfuro total estimado) alcanzando una concentración de 7 mM a las 720 h (curva en verde, **Figura 4.15**). La concentración de H_2S en solución (curva en violeta, **Fig. 4.15**), siempre más baja que la anterior, se incrementó hasta el final del crecimiento exponencial (408 h), alcanzando una concentración máxima de 1,5 mM; posteriormente comenzó su descenso asociado con el incremento del pH y, seguramente, debido al desplazamiento del equilibrio hacia la especie HS^- . La concentración de S^{2-} (curva en naranja, **Fig. 4.15**) fue prácticamente despreciable ($\sim 1 \times 10^{-7}$ mM y fracción molar menor al 0,001%) a lo largo de todo el proceso, como se espera a pH cercanos a la neutralidad. Por último, la concentración de H_2S gaseoso alcanzó un máximo de 0,1 mM (en 2 mL de atmósfera) a las 408 h representando el 2% del sulfuro estimado en el sistema (curva en gris, **Fig. 4.15**).

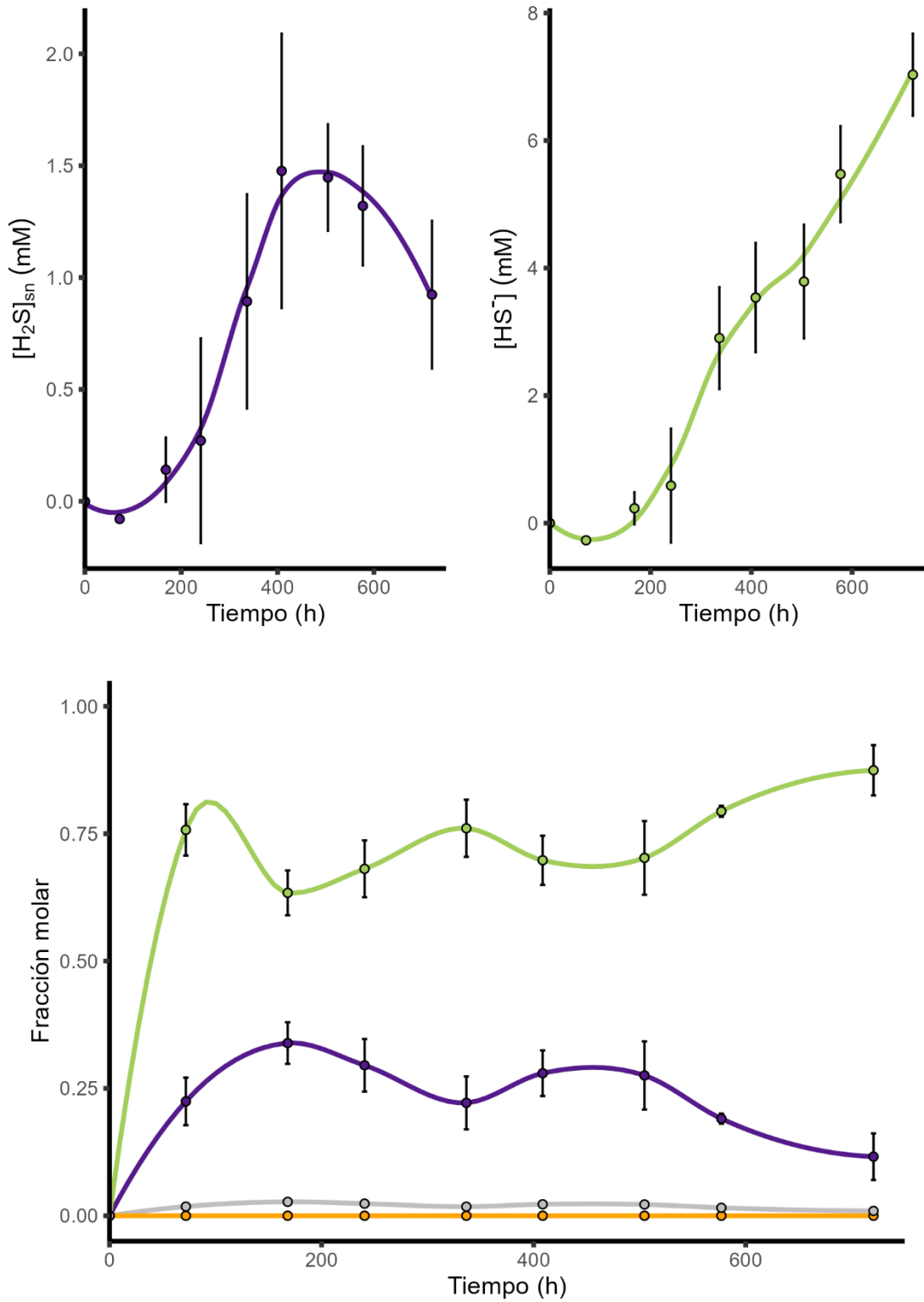
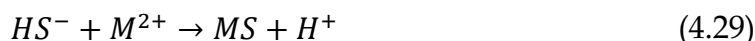


Figura 4.15- Concentraciones (en mM en los primeros dos gráficos y en fracción molar en el tercero) de las especies de sulfuro presentes en el sistema: H_2S (violeta), HS^- (verde) y S_2^- (naranja). En gris se muestra la fracción molar del H_2S gaseoso presente en la atmósfera.

A partir de la cantidad de sulfuro estimada, se construyeron diagramas de solubilidad para los distintos metales estudiados en este trabajo (Cd, Co, Cu, Ni y Zn) y Fe(II).

Como ya se ha mencionado, el sulfuro soluble en una solución acuosa puede reaccionar con los cationes metálicos presentes (de acuerdo con la **Ecuación 4.29**) formando compuestos de muy baja solubilidad.



El equilibrio de disolución de estos compuestos (**Ecuación 4.30**) se describe con la constante del producto de solubilidad (K_{ps}) (**Ecuación 4.31**).



$$K_{ps} = [M^{2+}][S^{2-}] \quad (4.31)$$

La **Tabla 4.8** muestra los valores de K_{ps} (Monhemius, 1977) reportados para los metales incluidos en los ensayos de este trabajo de tesis.

Tabla 4.8 – Producto de solubilidad (K_{ps}) para los sulfuros de los metales estudiados a 25°C

Metal	K_{ps}	p K_{ps}
Cd(II)	$1,26 \times 10^{-29}$	28,9
Co(II)	$7,94 \times 10^{-23}$	22,1
Cu(II)	$1,26 \times 10^{-36}$	35,9
Ni(II)	$1,00 \times 10^{-21}$	21,0
Zn(II)	$3,16 \times 10^{-25}$	24,5
Fe(II)	$1,58 \times 10^{-19}$	18,8

Dado que la concentración de las especies de sulfuro depende fuertemente del pH de la solución, la solubilidad de los sulfuros metálicos también lo hace, siendo estos más solubles en condiciones ácidas (en las que el equilibrio de las especies de sulfuro favorece a las especies hidrogenadas HS^- y H_2S); además, los protones pueden atacar los enlaces M-S de algunos metales. La **Figura 4.16** muestra la solubilidad de los diferentes metales en función del pH del medio utilizando una concentración de sulfuro total de 10 mM, de acuerdo con lo determinado en la experiencia anterior (indicada como referencia con una línea

punteada en color naranja). En el diagrama se muestra también la concentración de S^{2-} presente en esas condiciones de pH (línea naranja).

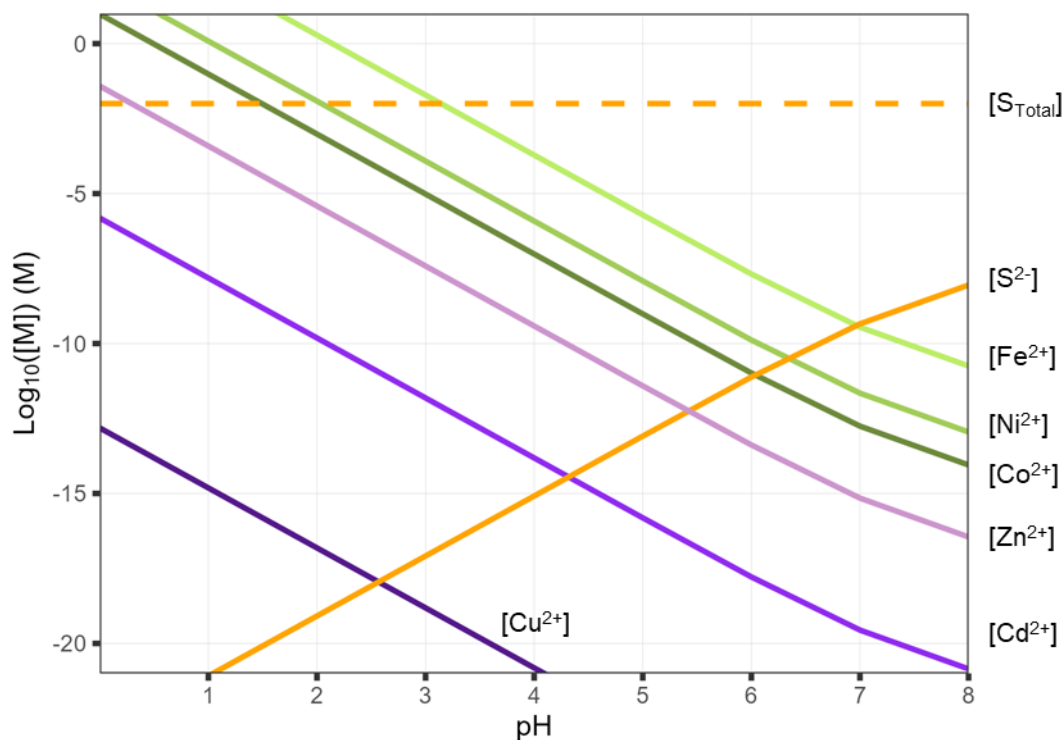


Figura 4.16 – Diagrama de solubilidad de cationes metálicos (como logaritmo de la concentración molar) en función del pH de la solución utilizando 10 mM de sulfuro total.

Se observa que, en condiciones cercanas a la neutralidad, la solubilidad de los seis metales estudiados es baja, por lo que sería factible su precipitación utilizando estas condiciones de cultivo de sulfato-reductores. Por el contrario, en condiciones más ácidas ($\text{pH} < 5$), las solubilidades de hierro, níquel y cobalto (líneas en verde) y, en menor medida, del zinc, aumentan considerablemente resultando poco viable la precipitación de estos cationes en estas condiciones. Por último, las solubilidades de cobre y de cadmio son mínimas en todo el rango de pH evaluado permitiendo su potencial separación por precipitación.

La **Figura 4.17** muestra la solubilidad de los cationes metálicos en función de la concentración de sulfuro total evaluado a dos pH. La línea punteada vertical en naranja representa la concentración de 10 mM de sulfuro total, de acuerdo con lo obtenido en el ensayo anterior para la producción de sulfuro por el cultivo del consorcio sulfato-reductor. En línea entera naranja se muestra la concentración de S^{2-} que se encuentra en equilibrio con cada concentración S total y con el catión metálico soluble. Los diagramas muestran que – similar a lo mencionado para la **Figura 4.16** – en condiciones ácidas, la precipitación de hierro, níquel y cobalto es muy poco favorable, incluso si se utilizan elevadas concentraciones de sulfuro. Por el contrario, la solubilidad de cobre y zinc es mínima y cualquier excedente de sulfuro podría formar compuestos insolubles. En condiciones circumneutrales la solubilidad de todos los metales es baja y la precipitación sería posible en las condiciones evaluadas.

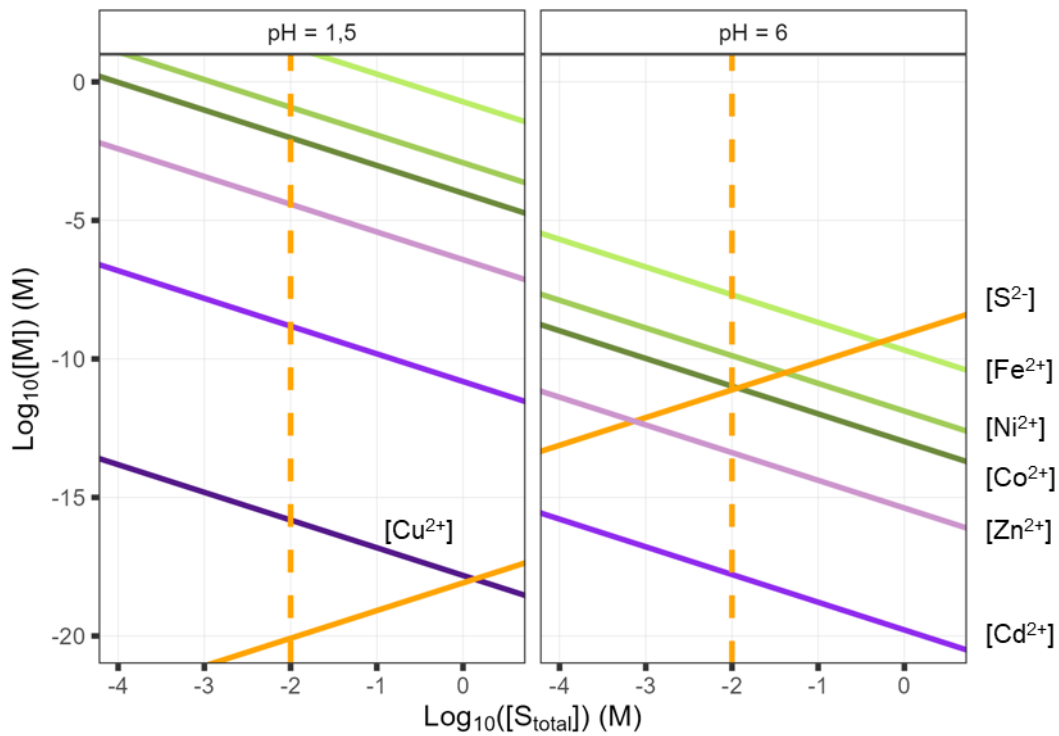


Figura 4.17 – Diagrama de solubilidad de cationes metálicos (como logaritmo de la concentración molar) en función de la concentración de sulfuro total en condiciones ácidas ($\text{pH}=1,5$) y circumneutrales ($\text{pH}=6$).

4.7.2. Conclusiones

El consorcio SAnCo confirmó su capacidad sulfidogénica siendo capaz de generar una concentración cercana a 10 mM de sulfuros en menos de 28 días en condiciones de pH neutrales con un rendimiento de $4,49 \times 10^{13}$ cél/mol_{SO₄}. De acuerdo a las curvas de solubilidad, con esa concentración de sulfuros sería posible la precipitación de los cinco metales estudiados en este trabajo de tesis y también la del hierro que se encuentra frecuentemente en efluentes y drenajes reales; no obstante, si se ensayaran condiciones ácidas, las solubilidades de hierro, níquel, cobalto, zinc serían elevadas y los procesos de bioprecipitación no permitirían una inmovilización significativa de los cationes de dichos metales.

4.8. Procesos de biorremediación: bioprecipitación de cobalto utilizando bacterias sulfato-reductoras

4.8.1. Introducción. Materiales y métodos

Se realizaron ensayos de precipitación de cobalto utilizando soluciones sulfurosas generadas por el consorcio anaeróbico SAnCo. Para ello, se prepararon 220 mL de medio PgF en condiciones anaeróbicas inoculados con $3,03 \times 10^7$ células/mL provenientes de cultivos crecidos del consorcio SAnCo. Una vez determinados los valores iniciales de pH y de concentración de sulfato, el medio inoculado fue fraccionado en viales (cada uno con un volumen máximo de 26 mL y que contenía 17 mL de medio) tapados y sellados con virola metálica. Los viales fueron incubados a 30°C durante 30 días. Idéntico procedimiento se siguió para controles abióticos que contenían el mismo volumen de medio sin inocular.

Transcurridos los 30 días de incubación, se consideró que los cultivos estaban crecidos – en base a lo determinado en la **sección 4.7** – y se midieron los valores finales de población celular por recuento al microscopio óptico, pH y concentración de sulfatos.

Posteriormente, se realizó un ensayo de precipitación usando cuatro concentraciones iniciales distintas de Co(II): 60 mg/L (1,02 mM), 120 mg/L (2,04 mM), 300 mg/L (5,09 mM) y 760 mg/L (12,90 mM). El ensayo se realizó por triplicado y se incluyeron controles abióticos utilizando el mismo medio de cultivo sin inocular. En cada caso, se agregó un volumen adecuado de una solución stock de CoCl_2 500 mM directamente sobre el vial crecido y se tomó muestra al instante. Luego, se incubó a los viales a 25°C y 120 rpm. Se tomaron muestras a las 24 horas y se les determinó el pH; las muestras fueron centrifugadas a 12 000 g durante 10 minutos y filtradas por membranas de 0,22 μm de diámetro de poro. Los filtrados fueron diluidos en solución 0,14 M de HNO_3 previo a la determinación de cobalto por espectrofotometría de absorción atómica.

4.8.2. Resultados

Al agregar la solución de cobalto sobre los cultivos sulfato-reductores desarrollados (con contenido de sulfuros), se observó la formación de compuestos insolubles al instante. Al cabo de 24 horas, la concentración de cobalto en solución disminuyó significativamente para las cuatro concentraciones iniciales usadas; en todos los casos, se detectó la aparición de un compuesto insoluble negro metálico (**Figura 4.18**).



Figura 4.18 – Compuestos insolubles de color negro metálico formados tras agregar una solución de cobalto (300 mg/L concentración final) al cultivo desarrollado del consorcio sulfato-reductor SAnCo.

La **Tabla 4.9** muestra los parámetros determinados en los distintos sistemas. La concentración inicial ($[Co^{2+}]_0$) corresponde a la cantidad de cobalto agregada al cultivo; la concentración final ($[Co^{2+}]_{Final}$) es la concentración soluble remanente tras 24 h de incubación a 25°C y 120 rpm, siendo DE_{Final} la desviación estándar de esta determinación en los triplicados. Luego, se calculó la diferencia entre la concentración inicial y la final ($\Delta[Co^{2+}]$). Se muestra la variación en el pH del cultivo, donde pH inicial es el valor del cultivo desarrollado (es decir, el pH final del crecimiento microbiano tras 30 días de incubación), y pH final es el valor luego de 24 h de agregada la solución metálica. Por último, se indica la

concentración de sulfuro total (ST) estimada en el sistema a partir del consumo de sulfato del cultivo durante los 30 días de incubación (ver **sección 4.7**).

Tabla 4.9 – Determinaciones en los diferentes sistemas de precipitación

Sistema	[Co ²⁺] ₀ (mM)	[Co ²⁺] _{Final} (mM)	DE _{Final} (mM)	Δ[Co ²⁺] (mM)	pH inicial	pH final	ST en el sistema (mM)
C1	1,02	0,05	0,01	0,97	6,9	8,0	10,7
C2	2,04	0,01	0,01	2,03	6,8	7,6	9,4
C5	5,09	0,9	0,5	4,2	6,8	7,4	11,4
C13	12,90	9,3	0,2	3,6	6,2	7,2	9,6

La **Figura 4.19** muestra la concentración de cobalto remanente en solución al cabo de 24 horas de reacción en los cultivos (violeta) y en los controles abióticos (verde), en los cuales la solución metálica fue agregada sobre medio de cultivo estéril.

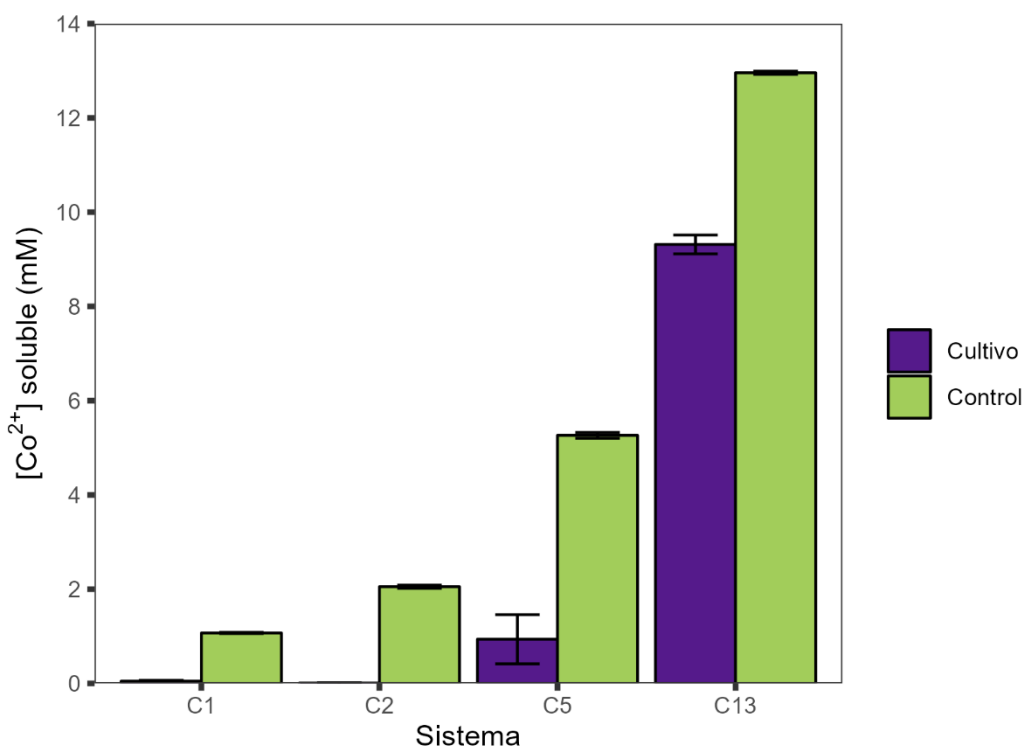


Figura 4.19 – Concentración de cobalto soluble tras 24 h de reacción en los cultivos (barras violetas) y en los controles (barras verdes), en los que el metal se agregó sobre medio de cultivo estéril.

Como puede apreciarse en la **Fig. 4.19**, no se detectaron procesos químicos que alterasen la concentración de cobalto en el medio de cultivo sin inocular, siendo la concentración final similar a la agregada. Por lo tanto, las diferencias observadas en los sistemas inoculados pueden atribuirse a la actividad microbiana, más precisamente, a la presencia de sulfuros.

En los sistemas en los que se adicionó 1,02 mM y 2,04 mM de cobalto, prácticamente todo el metal fue removido (>95%); en el sistema con 5,09 mM de Co(II), la remoción fue del 81% (4,2 mM) quedando poco menos de 1 mM de metal soluble; mientras que una cantidad similar fue removida del sistema con 12,90 mM representando 27% del total agregado.

De modo semejante a lo descrito en el ensayo de la sección anterior (**sección 4.7**), se determinó la concentración de sulfuro a partir del consumo de sulfato en los cultivos antes del agregado de cobalto. En todos los sistemas, la concentración promedio de sulfuro total presente fue, aproximadamente, 10 mM y se mantuvieron condiciones de pH neutrales. De acuerdo con la **Figura 4.17** de la **sección 4.7**, bajo estas condiciones, la solubilidad del Co^{2+} es muy baja (menor a 1×10^{-10} M), por lo tanto, la precipitación con sulfuro sería favorable. No obstante, los sistemas C5 y C13 mostraron remociones similares, a pesar de que el segundo contenía más del doble de metal, lo cual sugirió una limitación por parte de la disponibilidad de sulfuro en la solución.

En la **Figura 4.20** se representa para cada sistema la concentración inicial de cobalto agregada (barras violeta), la cantidad de metal precipitado calculada como la diferencia entre la inicial y la de equilibrio (barras lila), la concentración de sulfuro total (ST), determinada a partir del consumo de sulfato de los cultivos (barras gris) y las especies de sulfuro dominantes en las condiciones de equilibrio de la reacción (barras verde y naranja para H_2S y HS^- , respectivamente); las otras especies de sulfuro no se representaron por ser muy bajas, aunque se tuvieron en cuenta para los cálculos.

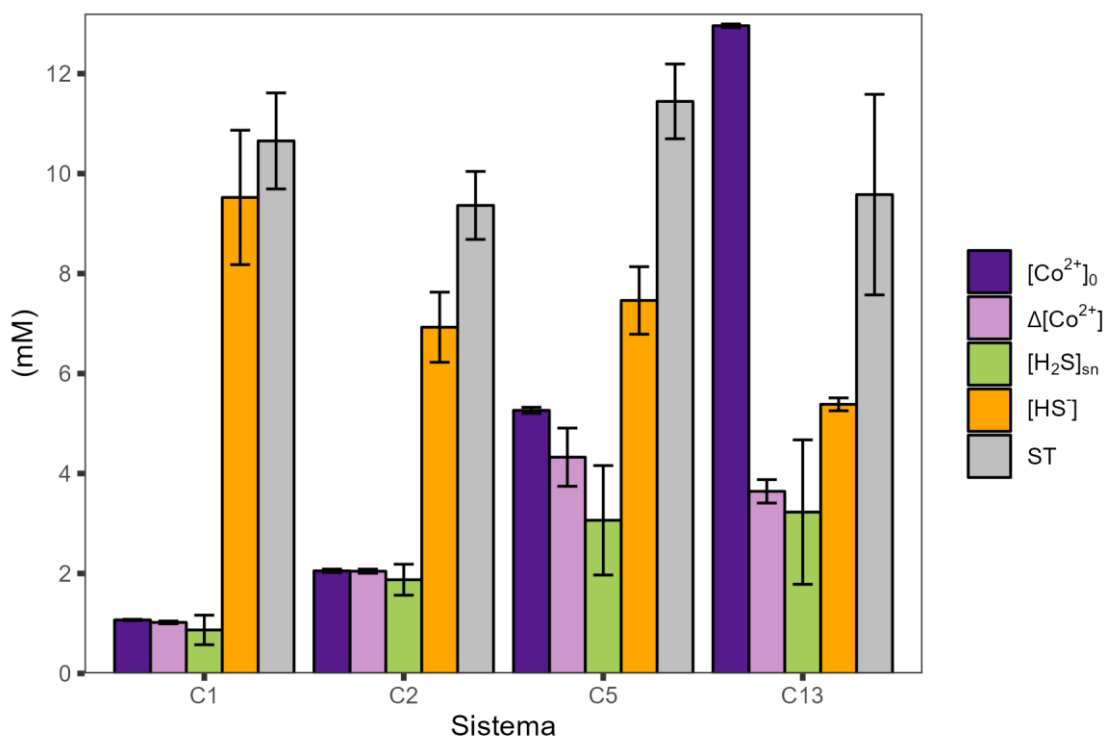


Figura 4.20 – Concentración de cobalto agregada a los sistemas (barras violetas), diferencia entre la concentración agregada y la concentración final – tras 24 h de reacción en los cultivos – (barras lila), concentración de sulfuro total (ST) en los cultivos (barras grises) y especies prevalentes de sulfuro en las condiciones de equilibrio (barras verde y naranja).

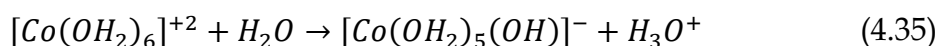
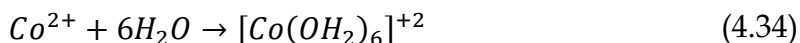
En la figura se observa que en los sistemas con baja concentración de cobalto (C1 y C2), las especies de sulfuro se encontraban en exceso respecto al metal; como se ha mencionado previamente, el bajo valor del K_{ps} para la especie CoS (8×10^{-23} a $25\text{ }^{\circ}C$ (ver **Tabla 4.8**)) explica perfectamente la precipitación prácticamente total del metal agregado. En el sistema C5, la concentración de sulfuro total duplicaba a la del metal, pero las especies de sulfuro se encontraban en la misma proporción que el catión metálico. Similar condición se presentó en el sistema C13, donde el cobalto se encontraba levemente en exceso respecto al sulfuro total, pero muy por encima de la concentración de las especies sulfuradas prevalentes. La variación de cobalto en estos sistemas, C5 y C13, fue similar (4,3 mM y 3,6 mM, respectivamente, una prueba t de Student reveló que no existían diferencias significativas entre estos valores).

Las diferentes proporciones observadas para las especies de sulfuro en cada sistema se deben a las diferencias en el valor del pH final (las condiciones de equilibrio) (**Tabla 4.9**). En todos los casos la variación del pH fue, aproximadamente, de una unidad; sin embargo, la menor concentración metálica agregada significó que los sistemas de baja concentración (C1 y C2) partieran de pH más altos y, por lo tanto, alcanzaran condiciones más alcalinas que los sistemas de alta concentración (C5 y C13).

Si bien la reacción de formación de los sulfuros metálicos genera protones, a partir de la disociación ácida del hidrógeno sulfuro (HS^-) ($K_a = 1 \times 10^{-14}$) (**ec. 4.32** y **4.33**), el incremento del pH puede entenderse de acuerdo con las reacciones de hidrólisis de los cationes metálicos.



El Co(II) en soluciones acuosas forma el complejo octaédrico $[Co(OH_2)_6]^{2+}$ (**ecuación 4.34**) y la reacción de hidrólisis de este compuesto tiene una constante de $2,2 \times 10^{-10}$ (Lincoln *et al.*, 2003) (**ecuación 4.35**). Dado que la constante de equilibrio de la hidrólisis es mayor a la constante de disociación del hidrógeno sulfuro (**4.32**), este proceso tiene mayor influencia en la regulación del pH de la solución. Al disminuir la concentración de catión por la reacción de precipitación (**4.33**), este equilibrio se desplaza hacia la izquierda consumiendo protones y, por ende, aumentando el pH.



4.8.3. Conclusiones

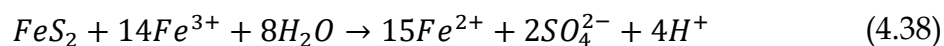
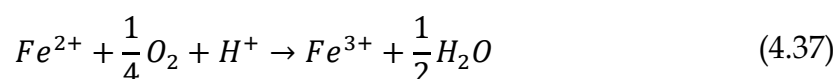
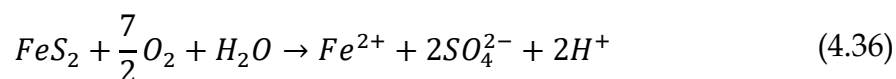
En este ensayo se evaluó la bioprecipitación de cobalto en soluciones acuosas de diferente concentración y pH neutral. En estas condiciones, la precipitación de este metal, de acuerdo con su valor de K_{ps} , es favorable, y fue confirmado al tratar con soluciones de hasta 2 mM de Co(II). Sin embargo, se observó que cuando la concentración de metal era mayor o del orden de la concentración de las especies de sulfuro presentes (~ 5 mM), la eficiencia de la precipitación se veía limitada y mostraba un comportamiento asintótico, sugiriendo, de esta manera, la necesidad de utilizar un exceso de sulfuro.

4.8. Procesos de biorremediación: bioprecipitación de metales de un drenaje ácido

4.8.1. Introducción. Materiales y métodos

Los drenajes ácidos de mina (DAM) constituyen uno de los mayores riesgos ambientales de la actualidad. Estos drenajes se generan cuando ciertos minerales sulfurados son expuestos a agua y oxígeno y se oxidan con producción neta de protones. El proceso puede ocurrir naturalmente (normalmente denominado drenaje ácido de roca), pero su extensión es limitada porque el área expuesta es muy baja. En los procesos mineros, las rocas son trituradas y/o molidas y eso incrementa significativamente su exposición y, consecuentemente, la posibilidad de generar DAM. De ese modo, es usual que se produzcan DAM en las minas en actividad, pero, fundamentalmente, en aquellas abandonadas sin un proceso adecuado de cierre (los denominados *Pasivos ambientales mineros*).

La pirita (FeS_2) es uno de los principales sulfuros productores de ácido; las ecuaciones siguientes (4.36-4.38) muestran los procesos de oxidación de esa especie mineralógica.



La acción oxidante del oxígeno (**ecuación 4.36**) ocurre lentamente; el ion férrico puede reemplazar al oxígeno en un proceso de oxidación mucho más rápido (**ecuación 4.38**), pero su generación en el medio (**ec. 4.37**), bajo condiciones abióticas y a pH relativamente ácidos (debajo de pH 4) es muy lenta. Debido a ello, los DAM raramente presentan pH inferiores a 3,5 excepto en la presencia de microorganismos hierro-oxidantes. Estos microorganismos catalizan la oxidación de Fe(II) (hasta un millón de veces a pH cercanos a 2) permitiendo la continuidad de la última reacción (**ecuación 4.38**), lo que provoca un descenso

significativo del pH y el incremento de la concentración de sulfato. La acidez y el carácter oxidante de los lixiviados es suficiente para atacar otros sulfuros metálicos, liberando otros metales pesados al medio. Los DAM generados de este modo presentan un elevado riesgo ambiental ya que pueden contaminar aguas subterráneas y superficiales cercanas transportando la contaminación a gran distancia respecto del punto de generación.

En esta sección se describe el ensayo de precipitación de los cationes metálicos presente en un DAM generado en un dique de cola de Mina La Concordia (Salta), utilizando una solución de sulfuros biogenerada.

La mina La Concordia se encuentra en el departamento de Los Andes, Salta, a 15 km de la localidad de San Antonio de Los Cobres (**Figura 4.21**). Se trata de un yacimiento de explotación subterránea que operó durante buena parte del siglo XX con producción de Zn, Pb y Cu; el mineral polimetálico allí presente posee una abundante cantidad de pirita. En 1986 la mina cesó sus actividades de explotación y producción y las instalaciones se abandonaron sin un adecuado procedimiento de cierre. El Arroyo La Concordia nace en un socavón de la mina, atraviesa los diques de cola ubicados en su quebrada y desemboca en el río San Antonio, que es la principal fuente de agua potable para la población de San Antonio de los Cobres y otras poblaciones aledañas.



Figura 4.21 – Mapa de la región donde se encuentra mina La Concordia, Salta, Argentina, en las cercanías de la localidad de San Antonio de los Cobres.

En el ensayo se utilizó un drenaje ácido de Mina La Concordia generado artificialmente¹². Para ello, se sometieron muestras de los diques de cola de la mina a la acción de microorganismos hierro-oxidantes aislados de la región; estos microorganismos pertenecían a las especies *A. ferrooxidans* y *A. ferriphilum*. Luego de tres meses de proceso, el lixiviado se filtró usando membranas de 0,3 μm de diámetro de poro para separar los sólidos y almacenar las fases líquidas. Las características principales (pH, potencial redox (Eh), electroconductividad (EC) y contenido metálico) del lixiviado se resumen en la tabla siguiente (4.10).

¹² Esta muestra de DAM corresponde a otro trabajo dentro del grupo de investigación. El proceso de obtención descrito no fue realizado por el autor de este trabajo de tesis doctoral.

Tabla 4.10 – Caracterización fisicoquímica del drenaje ácido utilizado

pH	1,6
Eh (mV)	573
EC (mS/cm)	11,2
Fe _{Total} (mg/L)	1657
Fe(II) (mg/L)	35
Zn (mg/L)	65
Cu (mg/L)	18

Por otro lado, se prepararon 3 cultivos del consorcio SAnCo en medio PgF (sin agregado de metal) en viales conteniendo 90 mL de medio y 5 mL de inóculo, herméticamente sellados y previamente burbujeados con nitrógeno (**Capítulo 2, sección 2.2.2**). Antes de sellar los viales, se tomaron muestras para determinar los valores iniciales del pH, de la población celular en suspensión y la concentración de sulfato, utilizando las mismas técnicas descritas en la **sección 4.2.7**. Al cabo de 30 días, los viales fueron abiertos y se repitieron las mismas medidas incluyendo la determinación del potencial redox.

A los cultivos crecidos se les agregó un 10% v/v del DAM generado artificialmente (relación 1 a 9); de esta manera se simuló el ingreso del drenaje a un reactor de crecimiento bacteriano (ver **Figura 4.22 A y 4.23**). Luego de una agitación discontinuada durante 1 h, se dejó reposar durante 24 h a 25°C para que sedimenten los compuestos insolubles formados. Posteriormente, se tomaron muestras de la solución acuosa que fueron filtradas por membrana de 0,3 µm de diámetro de poro. En los filtrados se determinó pH y Eh; además, cierto volumen de esos filtrados fue centrifugado a 12 000 g durante 10 minutos, diluido convenientemente con solución 0,14 M de HNO₃ y destinado a la determinación de Fe, Zn y Cu por espectrofotometría de absorción atómica.

En otro ensayo se probó una relación 3 a 1 (75% v/v) entre el DAM artificial y el cultivo (simulando una reacción *off-line*, donde el reactor de cultivo no entra en contacto con el efluente) (**Figura 4.22 B**). El procedimiento y las determinaciones fueron similares a las descritas más arriba (salvo la relación de volúmenes).

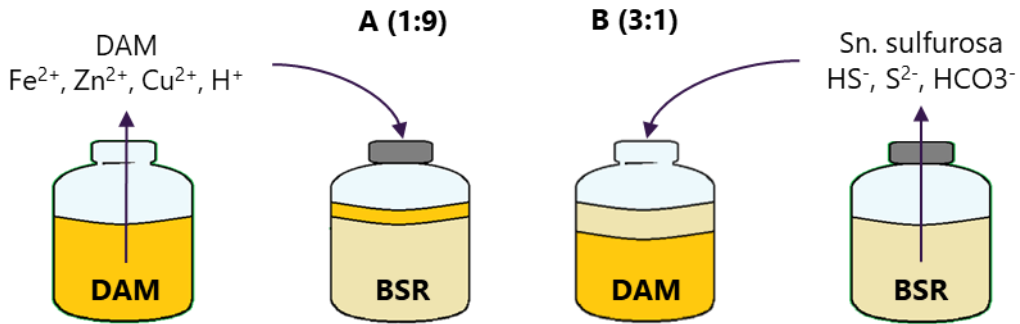


Figura 4.22 – Esquema del ensayo considerando las relaciones de volumen utilizadas en cada caso. DAM: muestra de drenaje ácido generado; BSR: cultivo de microorganismos sulfato-reductores.

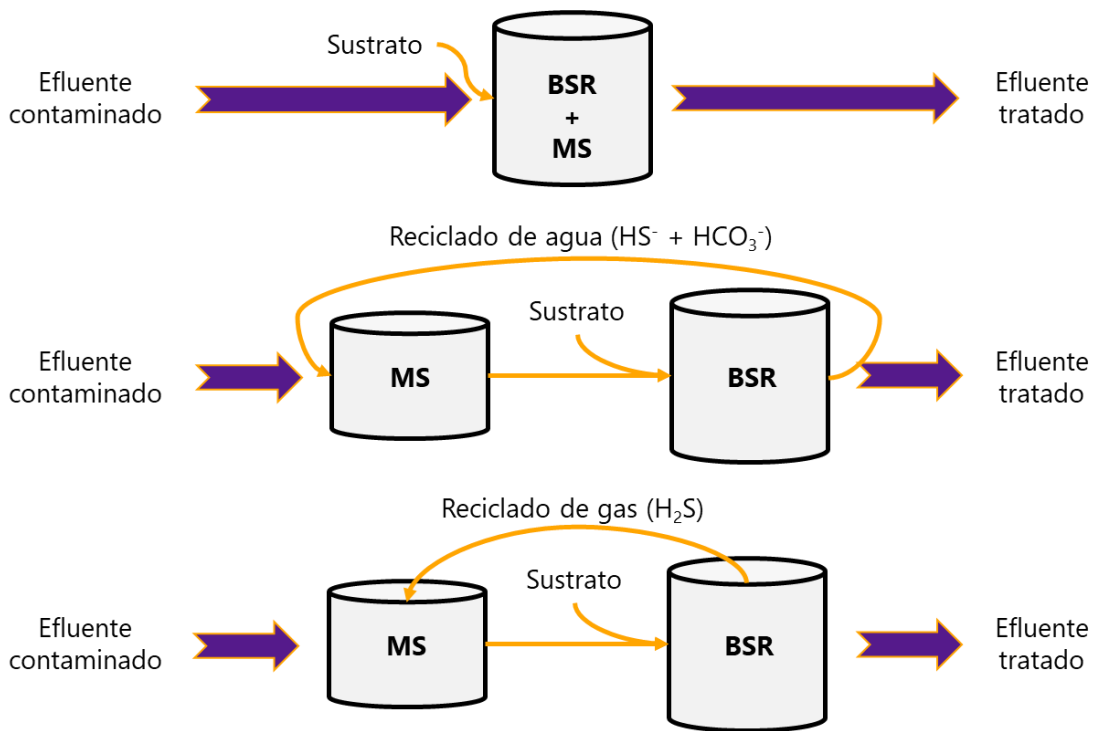


Figura 4.23 – [Figura 1.7, repetida para facilitar la lectura] Diseño de algunas estrategias ex-situ para el tratamiento de aguas contaminadas con metales utilizando bacterias sulfato-reductoras (BSR). Estos sistemas se basan en la inmovilización del metal como sulfuro metálico (MS) por reacción directa con el cultivo (diseños in-line, esquema superior), o, indirectamente, a través del reciclado de las soluciones sulfuradas biogeneradas o por insuflado del gas producido durante el crecimiento microbiano (diseños off-line, esquema central e inferior) (Figura a partir de Rambabu et al. (2020)).

4.8.2. Resultados

Una vez realizada la mezcla del DAM con la solución del cultivo en una relación 1 a 9, respectivamente, se produjo una reacción inmediata y se detectó la formación de compuestos insolubles de color negro (**Figura 4.24**). Las condiciones neutrales (el pH se mantuvo en 6,8 luego de la precipitación) y la concentración estimada de sulfuro total en la mezcla (9,2 mM, de acuerdo con el consumo de sulfato de los cultivos), que estaría en exceso respecto a las concentraciones de metales del DAM, favorecerían la precipitación de los cationes metálicos (ver **Figura 4.16** y **4.17**).

Los compuestos insolubles de color negro serían compatibles con la formación de CuS, cuyo K_{ps} es muy bajo ($2,0 \times 10^{-36}$), pero también coinciden con el color del FeS, que podría formarse previa reducción del Fe(III) por la acción reductora del cultivo. Si bien el FeS es mucho menos insoluble ($1,6 \times 10^{-19}$), las condiciones neutrales permitirían su precipitación. También, es altamente probable que haya precipitado Zn(II) presente en el DAM, ya que el ZnS tiene un K_{ps} de $3,2 \times 10^{-25}$ –incluso más bajo que el correspondiente a FeS–; si la precipitación de Zn(II) ocurrió, es probable que el color blanco que caracteriza a su sulfuro haya sido enmascarado por los precipitados negros.

Luego de 24 h, se observó un depósito sobre el precipitado original con color ocre-anaranjado (**Figura 4.24**) que corresponderían a compuestos insolubles de Fe(III) que precipitan al pH del medio. Durante la mezcla se produjo un esperado descenso de la capacidad reductora del cultivo (el Eh incrementó desde -401 a -206 mV) ya que el DAM es oxidante y, además, parte de los sulfuros precipitan con los iones metálicos.



Figura 4.24 – Formación de compuestos insolubles al agregar muestra de DAM a una solución de cultivo sulfato-reductor. A la izquierda, aparición instantánea de compuestos color negro; a la derecha, depósitos ocre-anaranjados formados tras 24 h de incubación a 25°C sin agitación.

Luego de 24 h, se determinó la concentración de los tres metales que originalmente estaban en el DAM. La **Tabla 4.11** muestra los resultados obtenidos; en ella se indica la concentración de cada ion metálico en el DAM y los valores de pH y Eh (*Original*), la concentración corregida por la dilución en la mezcla (el DAM se diluyó 1 en 10, en este caso) (*Dilución*) y la concentración de los metales, así como el valor de pH y Eh luego de 24 h de la mezcla (*Final*). La columna Δ muestra la diferencia entre la concentración de metal diluida y la concentración final alcanzada; se indica luego la desviación estándar de esa diferencia (*DE*). Por último, se muestra la relación porcentual de la diferencia respecto al valor inicial (la dilución). En **negrita** se indican las variaciones estadísticamente significativas (p-valor < 0,001).

Tabla 4.11 – Variación de los parámetros y el contenido metálico de la solución

	Original	Dilución	Final	Δ	DE	%
Fe (mM)	29,68	2,97	1,26	1,7	0,1	58%
Cu (mM)	0,28	0,03	0,00	0,03	0,00	100%
Zn (mM)	1,00	0,10	0,00	0,10	0,00	100%
pH	7,20	-	6,79			
Eh (mV)	-401	-	-206			

De acuerdo con los resultados obtenidos, la remoción de Cu y Zn fue total mientras que el Fe precipitó en un 58%. No obstante, es altamente probable que, en este último caso, parte haya precipitado como compuestos básicos insolubles y no como sulfuro.

En el segundo ensayo (con una relación muy superior de DAM a cultivo, 3 a 1) se observó una menor precipitación y el depósito fue ocre-amarillento (**Figura 4.25**).



Figura 4.25 – Compuestos insolubles formados tras 24 h de mezclar una muestra de DAM con un cultivo sulfato-reductor en una relación 3 a 1.

La **Tabla (4.12)** siguiente muestra los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas 24 h después de la mezcla.

Tabla 4.12 – Variación de los parámetros y el contenido metálico de la solución

	Original	Dilución	Final	Δ	DE	%
Fe (mM)	29,68	22,26	22,2	0,0	0,3	0%
Cu (mM)	0,28	0,21	0,10	0,11	0,01	52%
Zn (mM)	1,00	0,75	0,71	0,04	0,01	6%
pH	1,6	-	1,78			
Eh (mV)	573	-	482			
EC (mS/cm)	11,2	-	7,7			

En este caso, el pH de la mezcla fue aproximadamente 1,8, apenas superior a 1,6, que era el pH inicial del DAM, pero mucho más ácido que el cultivo (~7,2). Por otra parte, el Eh de la mezcla fue 91 mV (muy superior al Eh del cultivo, -401 mV). Como se mostró en las **Figuras 4.16** y **4.17**, a este valor de pH, el FeS es totalmente soluble y el ZnS es bastante soluble, lo cual justifica que no se determinaran diferencias significativas en la concentración soluble de estos metales tras 24 h de incubación. El cobre precipitó en un 52% bajo la forma de CuS (el único sulfuro con alta insolubilidad, aún en medios de pH algo superiores a 1); el color ocre se correspondería con lo reportado para la formación de sulfuros de cobre frente a bajas concentraciones de sulfuros (Lewis, 2010). En este caso, la concentración estimada de sulfuro total fue 2,3 mM (considerando la dilución efectuada al realizar la mezcla DAM-Cultivo), muy por debajo de la concentración metálica aportada por el DAM a la mezcla.

4.8.3. Conclusiones

En estos ensayos se ha comprobado que soluciones sulfuradas biogeneradas por consorcios sulfato-reductores, se pueden utilizar para la precipitación de los iones metálicos presentes en un DAM. Este procedimiento evita la inhibición que producirían los bajos valores de pH y las elevadas concentraciones de iones metálicos en los microorganismos con el DAM si hubiese contacto directo durante la sulfidogénesis. La relación de volúmenes DAM:solución sulfurada, además de producir un cambio en la concentración de los iones metálicos, define el pH de la mezcla, que es un factor clave para la eficiencia de la precipitación e incluso para la precipitación selectiva de los distintos metales presentes. En una relación 1 a 9 (DAM:solución sulfurada), el pH se mantuvo cercano a la neutralidad favoreciendo la precipitación de Cu(II) y Zn(II); sin embargo, en este diseño, el DAM ingresa al cultivo, impidiendo la recuperación de los metales (que queda mezclado con la biomasa) y poniendo en riesgo la viabilidad futura de los microorganismos. En una relación 3 a 1, diseño *off-line*, el pH fue demasiado bajo y sólo permitió la precipitación de la mitad del Cu(II) presente, pero el cultivo no entró en contacto con el drenaje y el metal precipitado sería recuperable.

4.9. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado con soluciones sulfuradas biogeneradas

4.9.1. Introducción. Materiales y métodos

En este ensayo, se evaluó la factibilidad de recuperación de cobre de un lixiviado de mineral de Taca Taca (ver **sección 4.2**) a través de su precipitación con soluciones sulfuradas biogeneradas por cultivos sulfato-reductores. Las características del biolixiviado (pH, electroconductividad (EC), potencial redox (Eh), y contenido metálico) se resumen en la siguiente tabla (**4.13**).

Tabla 4.13 – Caracterización fisicoquímica del biolixiviado de cobre utilizado

pH	2,1
Eh (mV)	513
EC (mS/cm)	4,3
Fe (mg/L)	117
Cu (mg/L)	131

Para el ensayo, se prepararon viales conteniendo 90 mL de PgF (sin metal) inoculados con 5 mL del consorcio SAnCo y se incubaron durante 30 días a 30°C. Se determinó el pH, la población celular en suspensión y la concentración de sulfato inicial y a los 30 días. Posteriormente, los cultivos fueron utilizados para la precipitación de cobre en dos ensayos con diferente relación de mezcla lixiviado:cultivo (por triplicado). Las dos relaciones usadas fueron 9 a 1 y 3 a 1; ambos sistemas simulaban un diseño *off-line* ya que se deseaba recuperar el metal.

Los viales conteniendo las mezclas se agitaron en forma esporádica durante 1 h antes de dejarlos reposar a 25°C durante 24 h para que decante el precipitado. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras de la solución y se filtraron a través de membranas de 0,3 µm de diámetro de poro; en los filtrados se midió pH, Eh y EC mientras que otra parte fue centrifugada a 12 000 g durante 10 min. El sobrenadante fue diluido con solución 0,14 M de HNO₃ y destinado a la determinación de Cu y Fe por espectrofotometría de absorción atómica.

4.9.1. Resultados

En la mezcla del primer ensayo (relación 9 a 1 de biolixiviado y cultivo) se observó la formación de compuestos insolubles color ocre en suspensión que, al cabo de un tiempo, decantaron. En la **Figura 4.26** se observa el sistema a los 10 minutos de realizada la mezcla y a las 24 h.

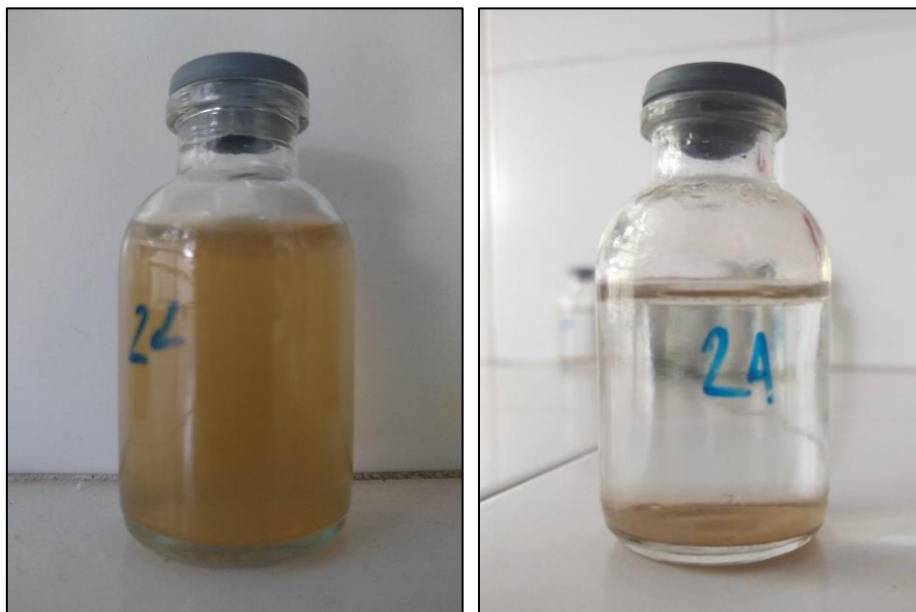


Figura 4.26 – Formación de compuestos insolubles al mezclar la solución de biolixiviado de cobre con solución de cultivo sulfato-reductor. A la izquierda, el sistema tras 10 minutos de realizada la mezcla; a la derecha, el sistema luego de 24 h.

En el sistema con la relación 3 a 1 (es decir, con mayor contenido de medio sulfurado que en el ensayo anterior), se detectaron compuestos insolubles de color ocre en suspensión, pero además se detectó un precipitado negro que decantó más rápidamente. En la **Figura 4.27** se observa el sistema unos minutos después de efectuada la mezcla y luego de 24 h.

En ambos sistemas, la cantidad de precipitado observado al cabo de 24 h fue apreciablemente inferior al formado durante los primeros minutos de reacción.

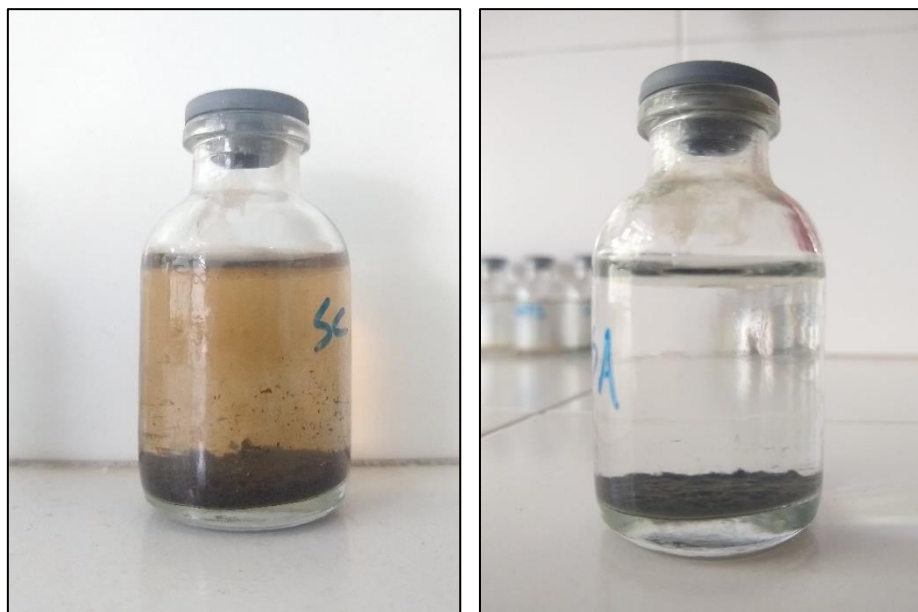


Figura 4.27 – Formación de compuestos insolubles al mezclar la solución de biolixiviado de cobre con solución de cultivo sulfato-reductor en una relación 3 a 1. A la izquierda, el sistema tras minutos de realizada la mezcla; a la derecha, el sistema luego de 24 h de incubación.

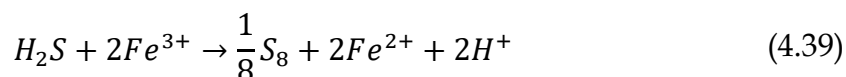
En la **Tabla 4.14** se muestran los resultados más importantes para ambos ensayos. Se indica la concentración de cada ion metálico en el biolixiviado y los valores de pH y Eh inicial (*Original*), la concentración corregida por la dilución en la mezcla (9 en 10 y 3 en 4, para cada ensayo respectivamente) (*Dilución*), y la concentración de los metales, así como el valor de pH y Eh luego de 24 h de efectuada la mezcla (*Final*). La columna Δ muestra la diferencia entre la concentración de metal diluida y la concentración final alcanzada; se indica luego la desviación estándar de esa diferencia (*DE*). Por último, se muestra la relación porcentual de la diferencia respecto al valor inicial (la dilución). En negrita se indican las variaciones estadísticamente significativas para la concentración de metales (p -valor < 0,001).

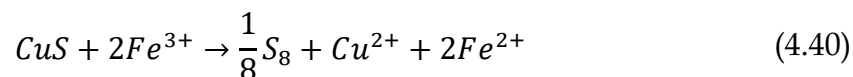
Tabla 4.14 - Variación de los parámetros y el contenido metálico tras realizar la mezcla

Cultivo/BLX		Original	Dilución	Final	Δ	DE	%
1/9	Fe (mM)	2,10	1,89	1,94	0,0	0,2	-2%
	Cu (mM)	2,07	1,86	1,73	0,14	0,07	7%
	pH	2,1	-	2,39			
	Eh (mV)	513	-	417			
	EC (mS/cm)	4,3	-	3,4			
1/3	Fe (mM)	2,10	1,58	1,57	0,01	0,1	1%
	Cu (mM)	2,07	1,55	1,11	0,4	0,08	28%
	pH	2,1	-	3,77			
	Eh (mV)	513	-	348			
	EC (mS/cm)	4,3	-	2,6			

En ambos sistemas el pH se incrementó respecto del valor inicial del lixiviado; en el sistema con la mayor relación lixiviado:cultivo, el pH fue 2,39 mientras que en el otro sistema llegó a 3,77. En estas condiciones, la precipitación de cobre utilizando sulfuros es favorable, pero no lo es la precipitación de hierro (**Figuras 4.16** y **4.17**). A pesar de ello, la precipitación de Cu(II) fue insignificante en el ensayo con una relación 1:9, esto podría deberse a que la concentración de sulfuro total presente en la mezcla (0,99 mM) fue muy inferior a la concentración metálica; pero, de todas maneras, aún sería suficiente para causar cierta precipitación. En el segundo caso, utilizando una mezcla 3:1 de biolixiviado y cultivo, el contenido de sulfuros fue mayor (2,52 mM) y se consiguió una mejor precipitación; aunque, de todos modos, ésta apenas alcanzó el 28%. Si bien la concentración de sulfuros y el pH favorecerían la precipitación, el rendimiento obtenido fue bajo, sugiriendo otro factor limitante.

La presencia de Fe(III) podría haber profundizado la limitación de sulfuro, ya que el ion férrico puede consumir sulfuros libres a través de procesos de oxido-reducción (**ec. 4.39**), y, además, el Fe(III) puede solubilizar el CuS formado a través de su lixiviación –precisamente ese es el proceso central en la biolixiviación de covelita (**ec. 4.40**)–.





De esta manera, la elevada concentración de Fe(III) presente en el lixiviado (a causa de la actividad de los microorganismos biolixiviantes, ver **sección 4.2**) compite a través de dos vías con la precipitación de los sulfuros metálicos, afectando considerablemente su rendimiento.

La capacidad del ion férrico de lixiviar el sulfuro de cobre formado puede explicar la inestabilidad (o *desaparición*) observada del precipitado al cabo de 24 h de incubación, y porqué la cantidad de compuestos insolubles era apreciablemente mayor durante los primeros minutos.

4.9.2. Conclusiones

En este ensayo se evaluó la posibilidad de recuperar el cobre solubilizado desde licores de biolixiviación a partir de la utilización de soluciones sulfuradas biogeneradas por consorcios sulfato-reductores. La justificación del uso de soluciones sulfuradas es semejante a la del ensayo realizado sobre residuos de DAM: esta metodología evita la inhibición que producirían las condiciones ácidas y de elevada carga metálica si existiera contacto directo entre los microorganismos y el biolixiviado durante la sulfidogénesis; además, facilitaría la recuperación del metal inmovilizado que, de otra forma, se encontraría mezclado con la biomasa y requeriría un paso extra de separación.

Los resultados muestran que es posible precipitar el cobre presente en el licor de biolixiviación, pero la remoción obtenida muy baja. El licor de biolixiviación no era tan ácido como el DAM (usado en el ensayo previo) lo que permitió realizar la precipitación a pH 4 donde el sulfuro de cobre es altamente insoluble; debido a ello, la baja precipitación de cobre debió estar vinculada a otros factores. Una de las razones puede ser la presencia de altas concentraciones de Fe(III) (como ocurre naturalmente en este tipo de residuos) que, como se ha anticipado, pueden oxidar tanto a las especies de sulfuro provenientes del cultivo como al sulfuro de cobre que pudiera formarse, generando así condiciones en las que la precipitación es poco estable. Por lo tanto, para favorecer el proceso de bioprecipitación es necesario no sólo monitorear las condiciones de pH y de concentración de Fe(III) del residuo o efluente sino, además, agregar una cantidad de sulfuro en amplio exceso estequiométrico.

4.10. Procesos de biorremediación: diseño de un sistema de precipitación de cationes por H₂S biogenerado

4.10.1. Introducción. Materiales y métodos

En los ensayos anteriores, se estudió la bioprecipitación de iones metálicos utilizando soluciones sulfuradas biogeneradas en una etapa previa e independiente. Si bien esa metodología evita el contacto del cultivo con la solución de iones metálicos, al utilizar el propio cultivo como solución sulfurada se discontinúa la generación de sulfuros y la actividad microbiana puede verse afectada. En una potencial aplicación de la metodología de bioprecipitación de cationes metálicos utilizando consorcios sulfato-reductores resulta relevante que no se discontinúe la biosulfidogénesis. Una alternativa para ello es utilizar el H₂S gaseoso biogenerado en los cultivos para precipitar los cationes metálicos en otro compartimento, como una primera aproximación para usar sistemas continuos. En función de analizar esta alternativa, se diseñaron sistemas a escala de laboratorio para bioprecipitar Cu(II).

El sistema de bioprecipitación denominado A (**Figura 4.28**) consistía de un vial con 90 mL de PgF (sin agregado de metal) inoculado con 5 mL del consorcio SAnCo (95 mL de solución, 25 mL de cámara superior) y sellado en anaerobiosis con virola metálica (BSR en la **Fig. 4.28**). El vial se conectó a través de una aguja colocada en el extremo de una manguera (Masterflex 6411-13, 0,7 mm de diámetro interno, Avantor, EEUU) y sellada con *parafilm*, a un erlenmeyer abierto a la atmósfera y que contenía 50 mL de una solución 300 mg/L de Cu(II) (agregado como CuSO₄) en agua acidulada (pH=5). El sistema fue incubado a 30°C durante 1 mes. Periódicamente se constató la actividad microbiana a través de la aparición de burbujas en el erlenmeyer y la potencial formación de compuestos insolubles.

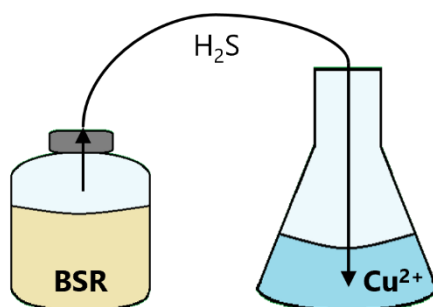


Figura 4.28 – Sistema A: vial de cultivo de microorganismos sulfato-reductores (BSR) conectado a un frasco Erlenmeyer abierto a la atmósfera y conteniendo una solución acuosa de cobre.

En el sistema B se utilizó un diseño similar al de A, pero se habilitó la conexión del vial con el erlenmeyer conteniendo $Cu(II)$ solo una vez que el consorcio SAnCo se había desarrollado completamente (30 días de incubación a $30^{\circ}C$; ver **Capítulo 2, sección 2.2.2**). Al realizarse la conexión se comprobó la sobrepresión del vial que provocó un inmediato burbujeo en el erlenmeyer. El sistema se mantuvo conectado durante otros 7 días a $20^{\circ}C$.

El sistema C (**Figura 4.29**) también contenía un cultivo ya desarrollado del consorcio SAnCo. El vial del cultivo se conectó con un vial de 60 mL conteniendo 50 mL de solución de $Cu(II)$ sellado con virola metálica y en el cuál previamente se había burbujeado nitrógeno para eliminar el oxígeno presente. Los dos viales se mantuvieron conectados a $20^{\circ}C$ durante 24 horas.

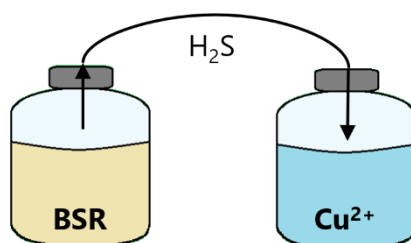


Figura 4.29 – Sistema C: vial de cultivo de sulfato-reductores ya desarrollado (BSR) conectado a otro vial sellado conteniendo la solución cuprosa. Se trata de un sistema cerrado.

El sistema D (**Figura 4.30**) se armó de modo similar al sistema C, pero el vial con la solución de Cu(II) previamente burbujeada con nitrógeno, se llenó completamente (60 mL) de modo de evitar una cámara superior. Una vez conectado, se extrajeron 8 mL del segundo vial (solución de Cu(II)) cuyo volumen fue sustituido por parte de la atmósfera reductora proveniente del primer vial (cultivo). El sistema se incubó a 20°C durante 24 horas.

Finalmente, el sistema E fue completamente similar al D excepto en que no se hizo burbujear nitrógeno a través de la solución de Cu(II).

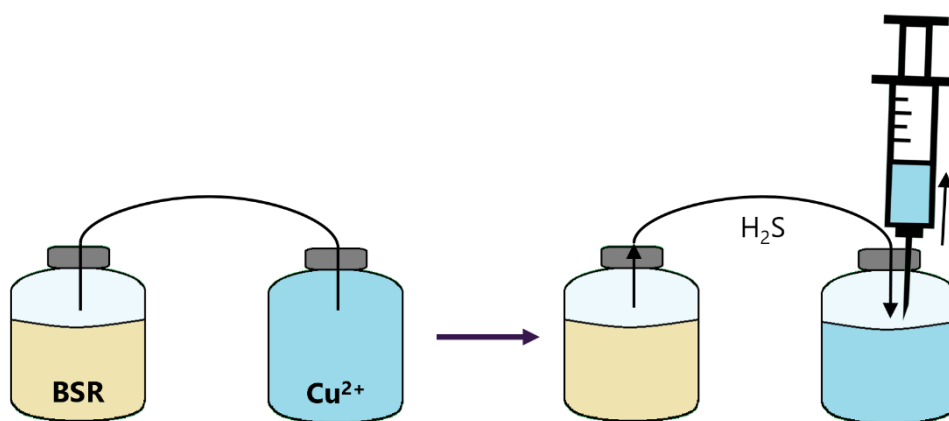


Figura 4.30 – Sistema D y E: vial de cultivo desarrollado de sulfato-reductores (BSR) conectado a un vial sellado y repleto hasta el tope de una solución de cobre. Una vez conectados los viales, se extrae un volumen del segundo vial con una jeringa y, por el vacío generado, se crea una atmósfera sulfurosa proveniente del vial BSR. El sistema permanece cerrado en tanto no se extraiga la jeringa.

La detección de compuestos insolubles se consideró evidencia suficiente de la precipitación de Cu(II). En esos casos, las muestras recolectadas fueron centrifugadas a 12 000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes se diluyeron en solución 0,14 M de HNO₃ antes de la determinación de cobre por espectrofotometría de absorción atómica.

4.10.2. Resultados

En el sistema A se observó burbujeo en la solución de Cu(II) que se mantuvo abierta a la atmósfera, indicando pasaje gaseoso desde la atmósfera del vial que contenía el cultivo. No obstante, no se observó formación de precipitados. El sistema B permitió un burbujeo más abundante sugiriendo una sobrepresión de H₂S en el vial conteniendo el cultivo, pero tampoco produjo precipitación apreciable.

El diseño C era un sistema cerrado y en el cual se había eliminado el oxígeno. Al conectar los viales, se produjo burbujeo de gas en el vial con la solución y, casi inmediatamente, se observó la precipitación de compuestos de color marrón que, al decantar luego de 10 minutos, mostraron un sólido oscuro. Al cabo de algunos días, se depositó una pátina verdosa, en correspondencia con lo reportado por Lewis (2010) respecto al envejecimiento de los sulfuros de cobre en soluciones acuosas (**Figura 4.31**).



Figura 4.31 – Compuestos insolubles formados en el Sistema C. A la izquierda, compuestos color marrón formados en la interfase líquido-gas que decantan hacia el fondo del vial. A la derecha, sedimentos color azul-verdoso tras días de maduración a temperatura ambiente.

El diseño D logró el objetivo de aumentar la transferencia de $\text{H}_2\text{S}(\text{g})$ y, consecuentemente, la precipitación se prolongó en el tiempo y fue más abundante que para el diseño C (**Figura 4.32**). La presencia de oxígeno no modificó el resultado (diseño E).



Figura 4.32 – Compuestos insolubles formados durante la experiencia del Sistema D y E. Puede observarse una mayor cantidad de partículas, con relación al Sistema C, y la acumulación en la interfase.

En los diseños en los que se observó precipitación, se determinó la concentración de $\text{Cu}(\text{II})$ en la solución al final del ensayo. En el caso del diseño C, los resultados en los cuadruplicados realizados mostraron baja reproducibilidad y la precipitación fue apenas significativa. Los diseños D y E mostraron mejor reproducibilidad y la concentración de $\text{Cu}(\text{II})$ remanente fue $240 \pm 9 \text{ mg/L}$ (4 repeticiones); es decir, precipitó el 20% del cobre inicialmente presente.

5.9.1. Conclusiones

En este ensayo se determinó la factibilidad de utilizar H₂S gaseoso biogenerado en cultivos de consorcios sulfato-reductores para precipitar cationes metálicos en un sistema independiente y sin afectar la continuidad del cultivo. Aunque no estaba previsto en este trabajo de tesis, estos resultados habilitan la realización de aplicaciones con cultivos continuos de estos consorcios y el uso del H₂S biogenerado de manera sistemática. También se comprobó que para lograr una precipitación adecuada de los cationes metálicos (o, al menos, del cobre), es indispensable mantener el sistema de precipitación cerrado para lograr un incremento en la presión parcial del gas y, consecuentemente, una mayor solubilidad que permita la concentración de sulfuro mínima para la precipitación del sulfuro metálico.

4.11. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado por H₂S biogenerado

4.11.1. Introducción

El diseño D que mostró su eficacia en el ensayo descrito en la sección anterior, fue utilizado para evaluar la inmovilización de cobre en los lixiviados del mineral de Taca Taca. Nuevamente se utilizó H₂S biogenerado por el consorcio SAnCo. Para ello, se usaron viales de 120 mL con 90 mL de medio y 5 mL de inóculo del consorcio SAnCo (previamente incubado durante 30 días a 30°C) como generadores del gas; en los viales de precipitación se agregaron 26 mL del lixiviado mencionado. Ambos viales fueron conectados con mangueras (Masterflex 6411-13, 0,7 mm de diámetro interno); una vez conectados, se removieron 2 mL del lixiviado con una jeringa para permitir una cámara de igual volumen y con atmósfera reductora.

El sistema se incubó a 25°C durante 24 h; los viales de precipitación se agitaron en forma esporádica. Posteriormente, se tomaron muestras de estos viales que fueron filtradas a través de membranas de 0,3 µm de diámetro de poro para determinar pH, Eh y EC; además, 2 mL fueron centrifugados a 12 000 g por 10 minutos y el sobrenadante fue diluido en solución 0,14 M de HNO₃ para la determinación de Cu(II) por espectrofotometría de absorción atómica. También se tomaron muestras de los viales con cultivo para la determinación de pH, población celular en suspensión y concentración de sulfato.

4.11.2. Resultados

Al conectar los viales se observó una inmediata formación de compuestos insolubles de color marrón sobre la interfase que al decantar y tras 24 h de incubación formaron un depósito negro (**Figura 4.33**).



Figura 4.33 – Formación de compuestos insolubles tras la transferencia de $H_2S(g)$ desde el cultivo microbiano. A la izquierda la formación durante los primeros minutos de transferencia, con acumulación en la interfase líquido-gas; a la derecha, los compuestos decantados luego de 24 h.

La **Tabla 4.15** muestra los principales resultados obtenidos. No se observó variación significativa en la acidez de la solución ni en la concentración de los metales, aunque, en un principio, se observó la formación de compuestos insolubles (**Fig. 4.33**, izquierda), muy pocos decantaron y permanecieron precipitados tras 24 h (**Fig. 4.33**, derecha). Por su parte, el potencial redox se redujo levemente al igual que lo hizo la electroconductividad. Todas estas observaciones pueden vincularse con la presencia de Fe(III) en la solución de biolixiviado (como se vio en la **sección 4.1** la acción de los microorganismos biolixiviantes cataliza la oxidación de Fe(II) y favorece la presencia en exceso de la especie oxidada). Tal como se mencionó durante los ensayos de bioprecipitación de la **sección 4.9**, el Fe(III) no sólo puede reaccionar con el

sulfuro transferido que haya solubilizado (oxidándolo), sino que, además, podría lixiviar el sulfuro de cobre formado. Por ello, los compuestos marrones formados en un primer momento podrían ser sulfuros de cobre que, en las condiciones de exceso de Fe(III) y de la acidez del medio, son inestables, por lo que no permanecieron durante mucho tiempo.

Tabla 4.15 – Variación de los parámetros y del contenido metálico tras la transferencia de gas

	Original	Final	Δ	DE	%
Fe (mM)	2,10	2,09	0,02	0,09	1%
Cu (mM)	2,07	2,04	0,03	0,05	1%
pH	2,10	2,14			
Eh (mV)	513	487			
EC (mS/cm)	4,3	4,1			

4.12. Procesos de biorremediación: precipitación de cobre de un lixiviado por soluciones sulfuradas y H₂S biogenerados

4.12.1. Introducción

En esta última sección, se decidió probar la precipitación de cobre del lixiviado usado en la **sección 4.2** por acción conjunta de soluciones sulfuradas y H₂S biogenerados. El lixiviado se diluyó para incrementar el pH y disminuir la concentración de hierro(III) que resultaron los principales factores por los cuales no se logró una precipitación considerable en los ensayos anteriores.

Las características del lixiviado diluido se muestran en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.16 - Caracterización fisicoquímica del biolixiviado diluido de cobre utilizado en este ensayo

pH	2,3
Eh (mV)	509
EC (mS/cm)	4,3
Fe (mg/L)	70
Cu (mg/L)	85

En los viales de precipitación se mezclaron 22 mL del lixiviado con 2,4 mL (~10% del volumen final) de una solución sulfurada neutra proveniente de un cultivo desarrollado del consorcio SAnCo. Los viales se agitaron en forma esporádica durante una hora y luego se dejaron reposar durante 24 horas a 25°C. Al cabo de ese tiempo, grupos de triplicados de viales fueron discontinuados y de ellos se tomaron muestras en las que se midieron pH, Eh y EC. De esos mismos viales se tomaron 2 mL que fueron centrifugados a 12 000 g por 10 minutos; el sobrenadante obtenido se diluyó con solución 0,14 M de HNO₃ antes de la determinación de las concentraciones de cobre y hierro utilizando espectrofotometría de absorción atómica.

Los viales de precipitación restantes (otro grupo de triplicados) se sellaron con virolas metálicas y se conectaron a viales conteniendo cultivos crecidos del consorcio (de acuerdo con diseño D de la **sección 4.10**). Luego de la conexión, se removieron 5 mL del lixiviado en cada vial para generar una cámara con atmósfera reductora proveniente del cultivo (**Figura 4.34**). Posteriormente, se incubó durante otras 24 h a 25°C. Luego de ese tiempo, se extrajeron muestras de las cuales se midieron los mismos parámetros: pH, Eh y EC. Simultáneamente, se tomaron muestras de los viales de cultivo y en ellos se determinó pH, población celular en suspensión y concentración de sulfato.

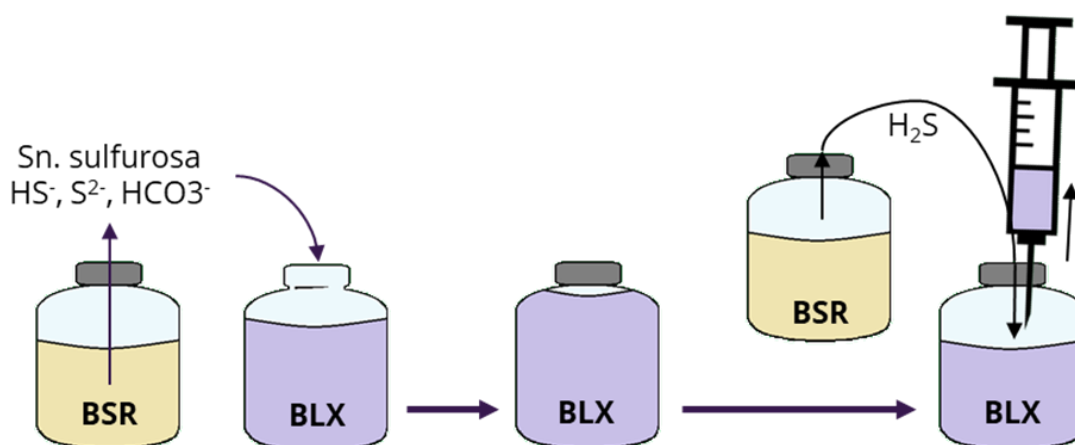


Figura 4.34 – Esquema del ensayo en dos pasos. Primero la adición de la solución sulfurosa proveniente de un cultivo sulfato-reductor (BSR); y luego, la generación de una atmósfera reductora.

4.12.2. Resultados

El agregado de la solución sulfurada biogenerada provocó la formación de compuestos insolubles ocre, tal cual se había observado en el ensayo similar de la **sección 4.9**. Luego, al transferir $H_2S(g)$, se observó la aparición de compuestos insolubles negros sobre la interfase que, al cabo de las horas, decantaron (**Figura 4.35**).

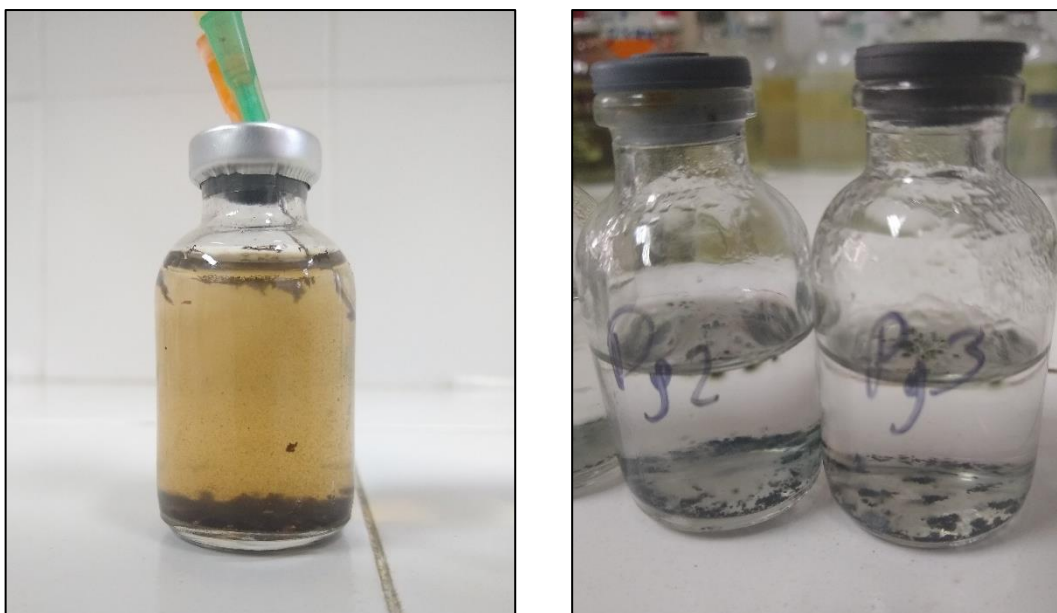


Figura 4.35 – Formación de compuestos insolubles durante el segundo paso del ensayo. A la izquierda la aparición de compuestos color negro sobre la interfase (las partículas en suspensión color marrón se formaron en el primer paso, tras el agregado de la solución sulfurosa); a la derecha, los precipitados decantados tras 24 h de incubación a 25°C.

La **Tabla 4.17** muestra los principales resultados de este ensayo luego del primer paso (P1), correspondiente al agregado de la solución sulfurada biogenerada, y del segundo paso (P2) correspondiente a la transferencia de H_2S . Dado que fueron procesos sucesivos, las condiciones iniciales para el segundo paso fueron las finales tras el agregado de la solución sulfurosa (P1), por ello, la evaluación de las significancias de las variaciones observadas en este segundo paso se realizó respecto a esos valores; aunque el valor de la diferencia en la concentración (Δ) se muestra respecto a la concentración inicial del residuo (*Dilución*), es decir, muestra la variación global del proceso.

Tabla 4.17 - Variación de los parámetros y del contenido metálico luego de cada paso del ensayo

		Original	Dilución	Final	Δ	DE	%
P1	Fe (mM)	1,26	1,14	1,24	-0,10	0,05	-9%
	Cu (mM)	1,34	1,20	0,88	0,32	0,03	27%
	pH	2,39		2,63			
	Eh (mV)	509		378			
	EC (mS/cm)	4,3		2,1			
P2	Fe (mM)	-	-	1,22	-0,08	0,08	-7%
	Cu (mM)	-	-	0,54	0,67	0,07	56%
	pH	-	-	2,66			
	Eh (mV)	-	-	268			
	EC (mS/cm)	-	-	2,4			

En la primera etapa se observó una disminución en la concentración soluble de cobre (27%). Simultáneamente, se determinó la reducción del potencial redox y de la electroconductividad junto con un leve aumento del pH. Estos últimos dos parámetros no se modificaron significativamente tras el segundo paso del proceso (P2), mientras que el potencial redox disminuyó ~100 mV más. Luego de este segundo paso (la generación de la atmósfera sulfurosa), la cantidad de cobre removido fue duplicada (27% en P1 y 56% tras P2); y, por el contrario, la concentración de hierro remanente permaneció invariable.

Los resultados indican que la combinación de los procesos permitió una mayor recuperación de cobre. Esto podría deberse a que el sulfuro agregado en la solución en el primer paso (estimado en 0,95 mM de sulfuro total en el vial) redujo gran parte del Fe(III) presente en el lixiviado, permitiendo que una mayor cantidad del H₂S transferido en el segundo paso solubilice y reaccione selectivamente con el cobre. Los sulfuros de cobre así formados, en ausencia de Fe(III), resultaron más estables que en los ensayos anterior.

Debe observarse que la variación de cobre soluble (0,67 mM) fue mayor a la obtenida en la **sección 4.9** (0,4 mM) cuando se agregaron 2,5 mM de sulfuro total a una solución de pH 4. Es decir, aquí se logró una mayor reducción de la concentración de cobre a pesar de realizarse en condiciones más ácidas; esto sugeriría que la presencia de Fe(III) sería más determinante para la precipitación que el pH de la solución.

4.12.3. Conclusiones

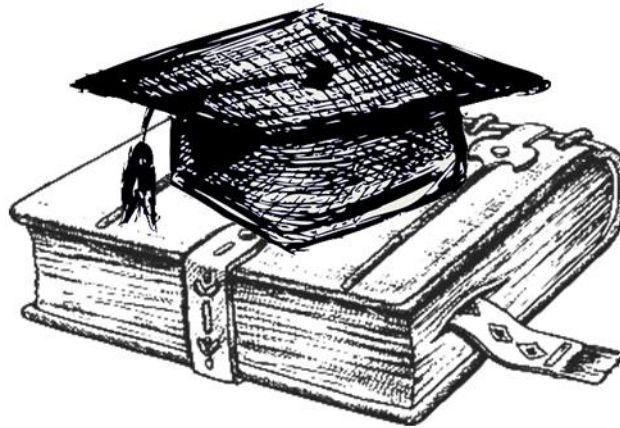
En este ensayo se evaluó la bioprecipitación de un residuo diluido (mayor pH y menor concentración metálica) en dos pasos sucesivos: un primer paso agregando una solución sulfurosa (la cual consumiría el hierro férrico) y un segundo paso transfiriendo una atmósfera reductora de H₂S (para la precipitación selectiva del cobre).

Se demostró que, efectivamente, es posible obtener un mejor rendimiento combinando ambos procesos, sugiriendo, además, que es indispensable el estudio de la presencia y de la interferencia de Fe(III) para evaluar la factibilidad de un proceso de bioprecipitación ya que esa especie suele ser el ion más abundante en residuos de biolixiviación y en drenajes ácidos.



CAPÍTULO V

Conclusiones generales y perspectivas



5.1. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis se obtuvieron y caracterizaron comunidades microbianas poli-extremófilas; se analizaron sus tolerancias a metales pesados y el impacto que éstos tienen sobre la estructura y la composición de los consorcios originados a partir de las comunidades; finalmente, se estudiaron posibles aplicaciones biotecnológicas dentro de la biominería y la biorremediación de metales pesados.

A partir de muestras de la región volcánica y geotermal de Cavihue-Copahue se obtuvieron consorcios con diferentes capacidades metabólicas. Muchos de estos consorcios mostraron una alta tolerancia a cinco metales pesados (cadmio, cobalto, cobre, níquel y zinc) por aclimatación sucesiva, desarrollándose incluso a concentraciones superiores a las resistidas por la mayoría de los microorganismos reportados en la literatura. La poli-resistencia manifestada resultó destacable, especialmente porque los metales ensayados no fueron detectados en cantidades significativas en el ambiente durante el muestreo y, por ende, no parece responder a una adaptación, al menos reciente, a las condiciones ambientales.

La alta capacidad adaptativa de la mayoría de los consorcios a la presencia de los metales ensayados se correlacionó con la presencia de genes específicos de resistencia a metales que codifican para mecanismos de expulsión de cationes a través de bombas de eflujo dependientes de ATP. El gen más distribuido entre los consorcios obtenidos fue *czcA*, que no es específico para un metal determinado, sino que proporciona resistencia a una variedad de cationes; su presencia justifica plenamente la poli-resistencia observada y, además, otorga mayor versatilidad y adaptabilidad a los consorcios frente a las variaciones frecuentes de las condiciones de este ambiente.

La exposición de las comunidades microbianas a los distintos metales bajo diferentes condiciones metabólicas demostró que la mayor presión de selección es provocada por las características del enriquecimiento y no por la naturaleza o por la concentración del catión metálico agregado. Además, no se observó una correlación entre la resistencia y la diversidad alfa, ni entre la diversidad alfa y la exposición, sugiriendo que la presencia de altas concentraciones de metal no significó una pérdida en la diversidad en estos consorcios como frecuentemente se acepta en la literatura específica. Ambos resultados resaltan, nuevamente, la naturaleza poli-resistente y versátil de las comunidades extremófilas estudiadas.

Aunque no hubo una pérdida de diversidad significativa, el estudio de las variaciones en la composición de los consorcios en función de la exposición a metales permitió encontrar algunos taxones con potencial para ser utilizados como bioindicadores, e incluso para un eventual proceso de biomonitoreo de la región de Caviahue-Copahue. Uno de los taxones con mayor potencial tiene una secuencia identificada como *Acidithiobacillus caldus* y ha sido siempre aislada y/o reportada en ambientes ácidos con presencia de metales (drenajes ácidos, pilas y tanques de biolixiviación, entre otros).

Dentro de las potenciales aplicaciones biotecnológicas, se demostró la capacidad biolixivante de dos consorcios litótrofos acidófilos de Agua de Limón sobre un mineral de cobre proveniente del proyecto minero Taca Taca (Salta, Argentina), cuya especie mineralógica predominante es la calcosina. Estos consorcios, pero principalmente uno, ALaCu, fueron capaces de liberar todo el cobre presente en la muestra en el transcurso de una semana sin generación de ácido. Los resultados obtenidos fueron suficientemente alentadores como para justificar un estudio más profundo para explotar dicho mineral por vía biohidrometalúrgica y, eventualmente, extender la aplicación a otros minerales similares de la zona cercana a Taca Taca.

Los microorganismos del género *Bacillus*, aislados de consorcios aeróbicos organótrofos de Salto del Agrio, mostraron su capacidad de biosorber iones metálicos. Esta biosorción se produjo sobre la superficie celular y el metal adsorbido pudo ser recuperado prácticamente en su totalidad utilizando soluciones ácidas diluidas. La utilización de los EPS, producido en cantidad por estos microorganismos, resultó un mejor adsorbente y mostró eficiencias de sorción para zinc y cadmio superiores a las reportadas para otros microorganismos, biomazas y compuestos comerciales. La eficiencia demostrada abre la puerta para la profundización y optimización de la biosorción de metales utilizando estos exopolímeros, lo que podría tener una aplicación comercial y/o a nivel de campo.

Uno de los consorcios anaeróbicos sulfato-reductor fue utilizado en la bioprecipitación de metales a través de diferentes diseños experimentales que no expusieran directamente los microorganismos a los metales. Se demostró la eficiencia para inmovilizar iones metálicos presentes en soluciones acuosas de metales, drenajes ácidos y licores de biolixiviación. En todos los casos, se observó que las condiciones de pH y el potencial redox (particularmente, la presencia de hierro férrico) son determinantes para la eficiencia del proceso. La combinación de soluciones con sulfuros y de atmósferas reductoras con H₂S, ambas generadas por el consorcio sulfato-reductor, demostró la mayor eficiencia para la inmovilización de iones metálicos.

En un breve resumen, en este trabajo de tesis se evidenció la natural adaptabilidad, versatilidad y poli-resistencia de la comunidad microbiana del sistema geotermal Caviahue-Copahue. Además, se alcanzaron resultados promisorios en la aplicación de los consorcios, microorganismos aislados y biomateriales obtenidos a partir de esa comunidad para la recuperación y remediación de iones metálicos que contribuirían a mitigar, en parte, los problemas de dispersión y contaminación producidos por la explotación y el uso de los metales.

5.2. PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis doctoral abre una enorme variedad de líneas de investigación y de estudios posibles para ser desarrollados en el futuro. Algunas de estas posibilidades ya fueron mencionadas a lo largo de esta tesis y se resumen a continuación.

◆ Procesos de biolixiviación utilizando el consorcio ALaCu. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de estudiar distintos aspectos básicos y aplicados; entre ellos se incluye el análisis de la adhesión microbiana y la formación de *biofilms* sobre el mineral, la posibilidad de utilizar agua de la zona (con alto contenido salino) para el desarrollo microbiano y distintos sistemas de biolixiviación (en columna, continuos) para determinar la factibilidad de la aplicación comercial del proceso.

◆ Aislamiento y caracterización del taxón dominante (identificado como perteneciente al género de arquea *Ferroplasma*) del consorcio ALaCu. Las cualidades tanto evolutivas como biotecnológicas que se reportan en bibliografía para este género justifican un estudio profundo de esta cepa que, además, de acuerdo con ciertas características observadas, podría corresponder a una especie dentro de este género no aislada aún.

◆ Aislamiento y caracterización del taxón dominante (identificado como *Acidithiobacillus caldus*) del consorcio ALaZn. En este caso, su estudio resulta importante porque secuencias idénticas han sido propuestas por otro grupo de investigación como una nueva especie de *Acidithiobacillus*, aunque hasta el momento no se ha ratificado la información. Además, ha mostrado un gran potencial para ser utilizado como bioindicador de contaminación con metales pesados lo que debería ser corroborado con estudios más específicos y profundos.

◆ Procesos de biosorción utilizando los EPS de las cepas de *Bacillus* aisladas de Salto del Agrio. Para determinar la importancia de la aplicación comercial y/o a campo de estos biosorbentes deben realizarse estudios adicionales que estaban fuera del alcance de este trabajo de tesis; entre otros, debe analizarse la influencia de factores como pH, temperatura y la presencia de otros iones metálicos sobre la eficiencia de la biosorción. También es necesario realizar estudios sistemáticos sobre los tratamientos de elución de la biomasa para analizar su capacidad de ser reutilizada en procesos sucesivos de sorción-desorción.

◆ Procesos de bioprecipitación de iones metálicos con consorcios sulfato-reductores. Son necesarios nuevos estudios para evaluar la factibilidad de la aplicación de estos procesos en residuos y efluentes reales. En el caso particular de los drenajes ácidos y de los licores de biolixiviación, resulta indispensable la realización de nuevos estudios que permitan determinar el efecto de la presencia de ion férrico (usual en aquellos sistemas) y su eventual eliminación para optimizar la bioprecipitación de los metales de interés.

◆ Profundización en los estudios genómicos sobre los genes de resistencia. En este trabajo de tesis no se lograron determinar los mecanismos de resistencia a níquel presentados por los consorcios resistentes a este metal; al mismo tiempo, se mostró la ausencia del operón *znt* en los consorcios acidófilos, lo que resultó llamativo ya que está reportada su presencia recurrente en la mayoría de estos microorganismos. Estos resultados ameritan una profundización en los estudios genómicos de los mecanismos de resistencia que permiten a los microorganismos de Caviahue-Copahue tolerar y resistir altas concentraciones de metales, aun cuando éstos no están presentes en abundancia en el ambiente. Además, sería interesante la realización de estudios de PCR cuantitativa para analizar la transferencia horizontal de estos genes y la sociabilización de la resistencia; estos estudios permitirían comprender cómo estas comunidades microbianas adquieren y diseminan sus cualidades adaptativas y poli-resistentes.

◆ Estudios de caracterización de la especie de *Lysinibacillus* (aislado denominado λ) aislada a partir de un consorcio de Salto del Agrio. Aunque no se reporta en la tesis, se logró comprobar que este aislado era resistente tanto a cobalto como a boro (hasta 50 mM). La minería de boratos tiene gran importancia económica en Argentina, pero su recuperación es dificultosa en los depósitos de baja ley. La caracterización de un microorganismo tolerante a boro y el estudio de su interacción con ese elemento podría ser relevante para desarrollar un proceso biotecnológico que permitiera el tratamiento de aquellos depósitos y la recuperación del boro a partir de ellos.

5.3. COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral han sido publicados en libros y revistas, y han sido presentados y divulgados en congresos de ciencia y técnica tanto nacionales como internacionales. A continuación, se detallan las producciones derivadas de este trabajo.¹³

5.3.1. Publicaciones en revistas

Massello, F.L., Donati, E., 2021. Effect of heavy metal-induced stress on two extremophilic microbial communities from Caviahue-Copahue, Argentina. *Environ Pollut.*, 268, 115709. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115709>

Massello, F.L., Chan, C.S., Chan, K.G., Goh, K.M., Donati, E., Urbietta, M.S., 2020. Meta-analysis of microbial communities in hot springs: Recurrent taxa and complex shaping factors beyond pH and temperature. *Microorganisms* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060906>¹³

Lopez Bedogni, G., **Massello, F.L.**, Giaveno, A., Donati, E.R., Urbietta, M.S., 2020. A deeper look into the biodiversity of the extremely acidic Copahue volcano-Río Agrio System in Neuquén, Argentina. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010058>¹³

5.3.2. Capítulos de libro

Urbietta, M.S., Lima, M.A., **Massello, F.L.**, Lopez Bedogni, G., Giaveno, M.A., Donati, E.R., 2021. Exploring Microbial Diversity and Heavy Metals Resistance in an Active Volcanic Geothermal System. En: *Extreme Environments*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 89-100.

¹³ Trabajos realizados en colaboración en los que se aplicaron conocimiento adquirido a lo largo de estos estudios de formación doctoral, pero que no contienen resultados pertenecientes a esta tesis.

5.3.3. Presentaciones en congresos de ciencia y técnica

Massello, F.L., Amar, A., Castro, C., Donati, E. Evaluación de la capacidad biolixiviante de dos consorcios microbianos sobre mineral del proyecto minero Taca Taca, Salta, Argentina. En: "Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental, CAMAyA", Argentina, septiembre, 2021.

Massello, F.L., Donati, E. Biosorción de cadmio y cinc por dos especies del género *Bacillus* provenientes de la región volcánica Caviahue-Copahue, Argentina. En: "ISME Latinoamérica", Colombia, 2021.

Massello, F.L., Donati, E. Análisis de ocurrencia de filotipos tras la exposición a metales pesados en enriquecimientos de una muestra ambiental del Río Agrio, Argentina. En: "ISME Latinoamérica", Colombia, 2021.

Bernardelli, C., **Massello, F.L.**, Donati, E. Microbial diversity across a natural extremely acidic environment: the Amarillo River, La Rioja, Argentina. En: "2nd International Symposium on Extreme Environments and Extremophiles Organisms", Chile, 2019. ¹³

Massello, F.L., Donati, E. Consorcios microbianos extremófilos tolerantes a metales pesados: Una nueva esperanza. En: "ISME Latinoamérica", Chile, 2019.

López Bedogni, G., **Massello, F.L.**, Urbieta, M.S., Donati, E. Biodiversidad procariota en el Río Agrio, Neuquén, Argentina. En: "ISME Latinoamérica", Chile, 2019. ¹³

Arciénaga, M., **Massello, F.L.**, Plaza Cazón, J., Urbieta, M.S., Donati, E. Secuenciación del gen 16S ARNr de residuos mineros para detectar potencial riesgo de drenaje ácido. En: "ISME Latinoamérica", Chile, 2019. ¹³

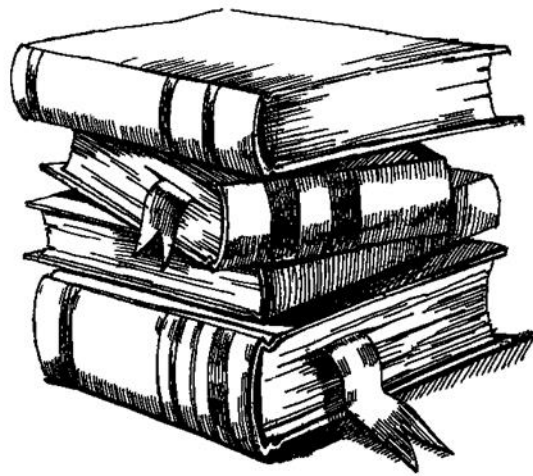
Lima, A., Issota, F., Moya-Beltrán, A., **Massello, F.L.**, Urbieta, M.S., Quatrini, R., Donati, E. Evaluación de perfil taxonómico y funcional de consorcios autótrofos y heterótrofos arsénico tolerantes recuperados de Salto del Agrio (Neuquén, Argentina). En: "ISME Latinoamérica", Chile, 2019. ¹³

Massello, F.L., Donati E. Selection of heavy metal-tolerant extremophilic consortia obtained from the volcanic area of Caviahue-Copahue, Neuquén. En: "Congreso Argentino de Microbiología General, SAMIGE", Argentina, 2018.

Donati, E., **Massello, F.L.**, Lima, A., Segretin, A.B. Prokaryotic assessment in geothermal and volcanic zones in Argentina: metal and metalloid resistances and biotechnological applications. En: "FEMS", España, 2017.



BIBLIOGRAFÍA



Abdu, N., Abdullahi, A.A., Abdulkadir, A., 2017. Heavy metals and soil microbes. *Environ. Chem. Lett.* 15, 65–84. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>

Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., Angle, J.S., 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051>

Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>

Akcil, A., Koldas, S., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *J. Clean. Prod.* 14, 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.006>

Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Aguilera, Á., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano, A., Fairén, A.G., de la Fuente, V., Luis Sanz, J., 2007. Extreme environments as Mars terrestrial analogs: The Rio Tinto case. *Planet. Space Sci.* 55, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.pss.2006.02.006>

Aminov, R.I., 2011. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>

Anaya-Garzon, J., Hubau, A., Joulian, C., Guezennec, A.G., 2021. Bioleaching of E-Waste: Influence of Printed Circuit Boards on the Activity of Acidophilic Iron-Oxidizing Bacteria. *Front. Microbiol.* 12, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.669738>

Anderson, J.A.H., Hooper, M.J., Zak, J.C., Cox, S.B., 2009. Characterization of the structural and functional diversity of indigenous soil microbial communities in smelter-impacted and nonimpacted soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 534–541. <https://doi.org/10.1897/08-281.1>

Andreou, L.V., 2013. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Methods Enzymol.* 529, 143–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00011-2>

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>

Appels, L., Lauwers, J., Degrve, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., Van Impe, J., Dewil, R., 2011. Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15, 4295–4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>

Arenas, F., Sanchez, I., Hawkins, S.J., Jenkins, S.R., 2006. The invasibility of marine algal assemblages: role of functional diversity and identity. *Ecology* 87, 2851-2861. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2851:tiomaa\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2851:tiomaa]2.0.co;2)

Aßhauer, K.P., Wemheuer, B., Daniel, R., Meinicke, P., 2015. Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics* 31, 2882–2884. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv287>

Atkins, P., Jones, L., 2001. *Chemistry: Molecules, Matter and Change*, 3rd ed. W. H. Freeman, Nueva York.

Avila-Jimenez, M.L., Burns, G., He, Z., Zhou, J., Hodson, A., Avila-Jimenez, J.L., Pearce, D., 2020. Functional associations and resilience in microbial communities. *Microorganisms* 8, 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060951>

Ayala-Muñoz, D., Simister, R.L., Crowe, S.A., Macalady, J.L., Burgos, W.D., 2021. Functional redundancy imparts process stability to acidic Fe(II)-oxidizing microbial reactors. *Environ. Microbiol.* 23, 3682–3694. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15259>

Azad, S. Al, Farjana, M., Mazumder, B., Abdullah-Al-Mamun, M., Haque, A.B.M.I., 2020. Molecular identification of a bacillus cereus strain from murrh buffalo milk showed in vitro bioremediation properties on selective heavy metals. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 7, 62–68. <https://doi.org/10.5455/JAVAR.2020.G394>

Azarbad, H., Niklińska, M., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Röling, W.F.M., Laskowski, R., 2013. Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1992–2002. <https://doi.org/10.1002/etc.2269>

Azeh Engwa, G., Udoka Ferdinand, P., Nweke Nwalo, F., N. Unachukwu, M., 2019. Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. En: *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?* IntechOpen, p. 23. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82511>

Azmatunnisa, M., Rahul, K., Lakshmi, K.V., Sasikala, C., Ramana, C., 2015. *Lysinibacillus acetophenoni* sp. nov., a solvent-tolerant bacterium isolated from acetophenone. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1741–1748. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000170>

Barton, L.L., Hamilton, W.A., 2009. *Sulphate-reducing bacteria*, 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541490>

Barton, L.L., Northup, D.E., 2011. *Microbial Ecology*, 1st ed. Wiley-Blackwell, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781118015841>

Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.P., Delignette-Muller, M.L., 2015. A Toolbox for Nonlinear Regression in R : The Package nlstools. *J. Stat. Softw.* 66, 1–21. <https://doi.org/10.18637/jss.v066.i05>

Begum, M.A., Rahul, K., Sasikala, C., Ramana, C.V., 2016. *Lysinibacillus xyleni* sp. nov., isolated from a bottle of xylene. *Arch. Microbiol.* 198, 325–332. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1194-8>

Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–60. <https://doi.org/10.1038/nature03891>

Benyahia, F., Embaby, A., 2016. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Desert Soil: Effect of Biostimulation, Bioaugmentation and Bioavailability in Biopile Treatment Systems. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 219. <https://doi.org/10.3390/ijerph13020219>

Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, R., Ouddane, B., Quillet, L., 2013. Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.12.007>

Besaury, L., Pawlak, B., Quillet, L., 2016. Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4013–4023. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3254-4>

Bilal, M., Shah, J.A., Ashfaq, T., Gardazi, S.M.H., Tahir, A.A., Pervez, A., Haroon, H., Mahmood, Q., 2013. Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater-A review. *J. Hazard. Mater.* 263, 322–333. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.071>

Bilgin, A.A., Silverstein, J., Jenkins, J.D., 2004. Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.08.018>

Blake, R., Shute, E.A., Waskovsky, J., Harrison, A.P., 1992. Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicrobiol. J.* 10, 173–192. <https://doi.org/10.1080/01490459209377919>

Blanck, H., Wängberg, S.-A., Molander, S., 1988. Pollution-Induced Community Tolerance – A New Ecotoxicological Tool, in: *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals*. ASTM International, pp. 219–219–12. <https://doi.org/10.1520/STP26265S>

Blindauer, C.A., 2011. Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 1011–1024. <https://doi.org/10.1007/s00775-011-0790-y>

Bonetto, J., Villaamil Lepori, E., Puntarulo, S., 2014. Update on the Oxidative Stress Associated with Arsenic Exposure. *Curr. Top. Toxicol.* 10.

Boon, E., Meehan, C.J., Whidden, C., Wong, D.H.J., Langille, M.G.I., Beiko, R.G., 2014. Interactions in the microbiome: Communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 90–118. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12035>

Boon, M., 1996. Theoretical and Experimental Methods in the Modelling of Bio-oxidation Kinetics of Sulphide Minerals. Doctoral Thesis, University of Technology Delf, Países Bajos. <http://resolver.tudelft.nl/uuid:d97e28be-eb6d-452b-8648-807c192a2600>

Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P., 2011. Numerical Ecology with R, Use R! Springer, Nueva York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7976-6>

Bowman, J.S., Ducklow, H.W., 2015. Microbial communities can be described by metabolic structure: A general framework and application to a seasonally variable, depth-stratified microbial community from the coastal West Antarctic Peninsula. *PLoS One* 10, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135868>

Brandis, A., Thauer, R.K., 1981. Growth of *Desulfovibrio* species on hydrogen and sulphate as sole energy source. *J. Gen. Microbiol.* 126, 249–252. <https://doi.org/10.1099/00221287-126-1-249>

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>

Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>

Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26, 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.05.004>

Brierley, J., Brierley, C., Goyak, G., 1986. AMT-BIOCALIM: a new wastewater treatment and metal recovery technology. En: *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 291–303.

Briones, A., Raskin, L., 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 270–276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00065-X)

Brock, T.D., 1978. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Springer Series in Microbiology. Springer, Nueva York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-6284-8>

Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L., 1972. *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.* 84, 54–68. <https://doi.org/10.1007/BF00408082>

Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>

Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3916–3923. <https://doi.org/10.1128/AEM.03022-05>

Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3–8. <https://doi.org/10.2436/im.v3i1.9235>

Cai, Q.Y., Mo, C.H., Wu, Q.T., Zeng, Q.Y., Katsoyiannis, A., Féraud, J.F., 2007. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. *J. Hazard. Mater.* 142, 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.08.062>

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P., 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11, 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Camacho-Chab, J.C., Castañeda-Chávez, M.D.R., Chan-Bacab, M.J., Aguila-Ramírez, R.N., Galaviz-Villa, I., Bartolo-Pérez, P., Lango-Reynoso, F., Tabasco-Novelo, C., Gaylarde, C., Ortega-Morales, B.O., 2018. Biosorption of Cadmium by Non-Toxic Extracellular Polymeric Substances (EPS) Synthesized by Bacteria from Marine Intertidal Biofilms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 314. <https://doi.org/10.3390/ijerph15020314>

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Casacuberta, E., González, J., 2013. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol. Ecol.* 22, 1503–1517. <https://doi.org/10.1111/mec.12170>

Castro, C., Donati, E., 2016. Effects of different energy sources on cell adhesion and bioleaching of a chalcopyrite concentrate by extremophilic archaeon *Acidianus copahuensis*. *Hydrometallurgy* 162, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.02.014>

Cavello, I., Urbieta, M.S., Segretin, A.B., Giaveno, A., Cavalitto, S., Donati, E.R., 2018. Assessment of Keratinase and Other Hydrolytic Enzymes in Thermophilic Bacteria Isolated from Geothermal Areas in Patagonia Argentina. *Geomicrobiol. J.* 35, 156–165. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1339144>

Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J., 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>

Cheng, M., Zhang, H., Zhang, J., Hu, G., Zhang, J., He, J., Huang, X., 2015. *Lysinibacillus fluoroglycofenilyticus* sp. nov., a bacterium isolated from fluoroglycofen contaminated soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 157–164. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0313-2>

Chiacchiarini, P., Lavalle, L., Giaveno, A., Donati, E., 2010. First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system, in: *Hydrometallurgy*. pp. 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.020>

Christiansen, K.S., Holm, P.E., Borggaard, O.K., Hauschild, M.Z., 2011. Addressing speciation in the effect factor for characterisation of freshwater ecotoxicity-the case of copper. *Int. J. Life Cycle Assess.* 16, 761–773. <https://doi.org/10.1007/s11367-011-0305-7>

Cohen, Y., Cohen, J.Y., 2008. *Statistics and Data with R: An Applied Approach Through Examples*, 1st ed. Wiley, Nueva York. <https://doi.org/10.1002/9780470721896>

Dalgaard, P., 2008. *Statistics and Computing*, 2nd ed. Springer, Nueva York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79054-1>

De Cáceres, M., Legendre, P., 2009. Associations between species and groups of sites: Indices and statistical inference. *Ecology* 90, 3566–3574. <https://doi.org/10.1890/08-1823.1>

De Cáceres, M., Legendre, P., Moretti, M., 2010. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119, 1674–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18334.x>

de Freitas, G.R., da Silva, M.G.C., Vieira, M.G.A., 2019. Biosorption technology for removal of toxic metals: a review of commercial biosorbents and patents. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 19097–19118. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05330-8>

de Mendiburu, F., 2017. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R Package Version 1.2-8. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

Del Campo, J., Balagué, V., Forn, I., Lekunberri, I., Massana, R., 2013. Culturing Bias in Marine Heterotrophic Flagellates Analyzed Through Seawater Enrichment Incubations. *Microb. Ecol.* 66, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0251-y>

Del Campo, J., Sieracki, M.E., Molestina, R., Keeling, P., Massana, R., Ruiz-Trillo, I., 2014. The others: Our biased perspective of eukaryotic genomes. *Trends Ecol. Evol.* 29, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.03.006>

Delabary, G.S., Lima, A.O. de S., Castro da Silva, M.A., 2017. Characterization of acidophilic bacteria related to *Acidiphilium cryptum* from a coal-mining-impacted river of South Brazil. *Brazilian J. Aquat. Sci. Technol.* 20. <https://doi.org/10.14210/bjast.v20n2.7857>

DiazRavina, M., Baath, E., 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2970–2977. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2970-2977.1996>

Donati, E.R., Sand, W., 2007. *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Microbial processing of metal sulfides. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7>

Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J.P., Bond, P.L., 2004. Characterization of *Ferroplasma* Isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., Extreme Acidophiles from Acid Mine Drainage and Industrial Bioleaching Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2079–2088. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2079-2088.2004>

Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149, 1959–1970. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>

Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: Metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26296-0>

Dopson, M., Holmes, D.S., 2014. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5982-2>

Dopson, M., Ossandon, F.J., Lövgren, L., Holmes, D.S., 2014. Metal resistance or tolerance? Acidophiles confront high metal loads via both abiotic and biotic mechanisms. *Front. Microbiol.* 5, 10–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00157>

Doran, P.M., 2013. Homogeneous Reactions. En: *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier, Amsterdam, pp. 599–703. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00012-5>

Duffus, J.H., 2002. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>

Dufrêne, M., Legendre, P., 1997. Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach. *Ecol. Monogr.* 67, 345–366. <https://doi.org/10.2307/2963459>

Dufresne, S., Bousquet, J., Boissinot, M., Guay, R., 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, Gram-positive, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1056-1064. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1056>

Dushyantha, N., Batapola, N., Ilankoon, I.M.S.K., Rohitha, S., Premasiri, R., Abeysinghe, B., Ratnayake, N., Dissanayake, K., 2020. The story of rare earth elements (REEs): Occurrences, global distribution, genesis, geology, mineralogy and global production. *Ore Geol. Rev.* 122, 103521. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2020.103521>

Dutta, C., Pan, A., 2002. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *J. Biosci.* 27, 27–33. <https://doi.org/10.1007/BF02703681>

EITI, 2021. Reporte Argentina, Segundo ciclo, 2019. Iniciativa para la Transparencia de las Industrias Extractivas, Secretaria de Minería, Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/produccion/eiti>

Epelde, L., Lanzén, A., Blanco, F., Urich, T., Garbisu, C., 2015. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiu007>

Erazo, N.G., Dutta, A., Bowman, J.S., 2021. From microbial community structure to metabolic inference using paprica. *STAR Protoc.* 2, 101005. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.101005>

Esposito, A., Pagnanelli, F., Lodi, A., Solisio, C., Vegliò, F., 2001. Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy* 60, 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00195-X)

Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S. J., Newman, A.P., 2021. A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. *Chemosphere* 268, 129290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129290>

Fetzer, I., Johst, K., Schäwe, R., Banitz, T., Harms, H., Chatzinotas, A., 2015. The extent of functional redundancy changes as species' roles shift in different environments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14888–14893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505587112>

Fierros-Romero, G., Gómez-Ramírez, M., Arenas-Isaac, G.E., Pless, R.C., Rojas-Avelizapa, N.G., 2016. Identification of *Bacillus megaterium* and *Microbacterium liquefaciens* genes involved in metal resistance and metal removal. *Can. J. Microbiol.* 62, 505–513. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0507>

Flynn, B., Palmer, I., 2011. Functional and phylogenetic diversity as predictors of biodiversity. *Ecology* 92, 1573–1581. <https://doi.org/10.1002/ana.21171>

Fosso-Kankeu, E., Mulaba-Bafubiandi, A.F., Piater, L.A., Tlou, M.G., 2016. Cloning of the *cnr* operon into a strain of Bacillaceae bacterium for the development of a suitable biosorbent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2069-5>

Fourest, E., Roux, J.C., 1992. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 399–403. <https://doi.org/10.1007/BF00211001>

Franke, S., Grass, G., Rensing, C., Nies, D.H., 2003. Molecular analysis of the copper-transporting CusCFBA efflux system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 3804–3812. <https://doi.org/10.1128/jb.185.13.3804-3812.2003>

Frossard, A., Donhauser, J., Mestrot, A., Gygax, S., Bååth, E., Frey, B., 2018. Long- and short-term effects of mercury pollution on the soil microbiome. *Soil Biol. Biochem.* 120, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.028>

Galun, M., Galun, E., Siegel, B. Z., Keller, P., Lehr, H., Siegel, S. M., 1987. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: kinetic and uptake parameters. *Water, Air, and Soil Pollution* 33, 359–371. <https://doi.org/10.1007/BF00294204>

Gammons, C.H., Wood, S.A., Pedrozo, F., Varekamp, J.C., Nelson, B.J., Shope, C.L., Baffico, G., 2005. Hydrogeochemistry and rare earth element behavior in a volcanically acidified watershed in Patagonia, Argentina. *Chem. Geol.* 222, 249–267. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.06.002>

Gentina, J.C., Acevedo, F., 2013. Application of bioleaching to copper mining in Chile. *Electron. J. Biotechnol.* 16. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-12>

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H., Zhang, J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r80>

Giaveno, M.A., Urbieta, M.S., Ulloa, J.R., González Toril, E., Donati, E.R., 2013. Physiologic Versatility and Growth Flexibility as the Main Characteristics of a Novel Thermoacidophilic Acidianus Strain Isolated from Copahue Geothermal Area in Argentina. *Microb. Ecol.* 65, 336–346. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0129-4>

Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biol. Biochem.* 41, 2031–20137. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.026>

Girtan, M., Wittenberg, A., Grilli, M.L., de Oliveira, D.P.S., Giosuè, C., Ruello, M.L., 2021. The Critical Raw Materials Issue between Scarcity, Supply Risk, and Unique Properties. *Materials (Basel)*. 14, 1826. <https://doi.org/10.3390/ma14081826>

Godoy-Faúndez, A., Antizar-Ladislao, B., Reyes-Bozo, L., Camaño, A., Sáez-Navarrete, C., 2008. Bioremediation of contaminated mixtures of desert mining soil and sawdust with fuel oil by aerated in-vessel composting in the Atacama Region (Chile). *J. Hazard. Mater.* 151, 649–657. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.038>

Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., Lawrence, J.G., 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2226–2238. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004046>

Goldberg, M., Pribyl, T., Juhnke, S., Nies, D.H., 1999. Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the RND protein family. *J. Biol. Chem.* 274, 26065–26070. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26065>

Golyshina, O.V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondrat'eva, T.F., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 997–1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-997>

Golyshina, O.V., Timmis, K.N., 2005. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environ. Microbiol.* 7, 1277–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00861.x>

Golyshina, O.V., Tran, H., Reva, O.N., Lemak, S., Yakunin, A.F., Goesmann, A., Nechitaylo, T.Y., Lacono, V., Smedile, F., Slesarev, A., Rojo, D., Barbas, C., Ferrer, M., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., 2017. Metabolic and evolutionary patterns in the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum* YT. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03904-5>

Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E., Sofer, S.S., 1990. Comparison of cadmium biosorption by Gram-positive and Gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnology letters* 12, 839–842. <https://doi.org/10.1007/BF01022606>

Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microb. Cell Fact.* 15, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>

Grass, G., Große, C., Nies, D.H., 2000. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. *J. Bacteriol.* 182, 1390–1398. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1390-1398.2000>

Graul, C., 2016. leafletR: Interactive Web-Maps Based on the Leaflet JavaScript Library. R package version 0.4-0. <http://cran.r-project.org/package=leafletR>

Green-Ruiz, C., Rodriguez-Tirado, V., Gomez-Gil, B., 2008. Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. *Bioresource technology* 99, 3864–3870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.047>

Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M., Brors, B., 2014. Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* 30, 2811–2812. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu393>

Guo, X., You, X.Y., Liu, L.J., Zhang, J.Y., Liu, S.J., Jiang, C.Y., 2009. *Alicyclobacillus aeris* sp. nov., a novel ferrous-and sulfur-oxidizing bacterium isolated from a copper mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2415–2420. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008870-0>

Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Reports* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>

Hall, K.R., Eagleton, L.C., Acrivos, A., Vermeulen, T., 1966. Pore-and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern conditions. *Industrial & engineering chemistry fundamentals* 5, 212–223.

Hallberg, K.B., Johnson, D.B., 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* 71, 139–148. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00150-6)

Hamill, P.G., Stevenson, A., McMullan, P.E., Williams, J.P., Lewis, A.D.R., S, S., Stevenson, K.E., Farnsworth, K.D., Khroustalyova, G., Takemoto, J.Y., Quinn, J.P., Rapoport, A., Hallsworth, J.E., 2020. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Sci. Rep.* 10, 5948. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>

Hammami, A., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., 2007. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. *J. Environ. Manage.* 84, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2006.06.015>

Handelsman, J., 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 669–685. <https://doi.org/10.1128/MBR.68.4.669-685.2004>

Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., Rensing, C., 2005. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0224-3>

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour. Technol.* 64, 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00161-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00161-2)

Hawkes, R.B., Franzmann, P.D., O'hara, G., Plumb, J.J., 2006. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap. *Extremophiles* 10, 525–530. <https://doi.org/10.1007/s00792-006-0527-y>

Hemmat-Jou, M.H., Safari-Sinegani, A.A., Mirzaie-Asl, A., Tahmourespour, A., 2018. Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology* 27, 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>

Hemme, C.L., Green, S.J., Rishishwar, L., Prakash, O., Pettenato, A., Chakraborty, R., Deutschbauer, A.M., Van Nostrand, J.D., Wu, L., He, Z., Jordan, I.K., Hazen, T.C., Arkin, A.P., Kostka, J.E., Zhou, J., 2016. Lateral gene transfer in a heavy metal-contaminated-groundwater microbial community. *MBio* 7. <https://doi.org/10.1128/mBio.02234-15>

Hill, J.T., Demarest, B.L., Bisgrove, B.W., Su, Y., Smith, M., Yost, H.J., 2014. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Developmental Dynamics*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24183>

Himmel, M.E., Xu, Q., Luo, Y., Ding, S.Y., Lamed, R., Bayer, E.A., 2010. Microbial enzyme systems for biomass conversion: Emerging paradigms. *Biofuels* 1, 323–341. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.25>

Hiraishi, A., Inagaki, K., Tanimoto, Y., Iwasaki, M., Kishimoto, N., Tanaka, H., 1997. Phylogenetic characterization of a new thermoacidophilic bacterium isolated from hot springs in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 43, 295–304. <https://doi.org/10.2323/jgam.43.295>

Hollander, M., A. Wolfe, D., Chicken, E., 2015. *Nonparametric Statistical Methods*, Wiley Series in Probability and Statistics. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119196037>

Holt, E.A., Miller, S.W., 2011. Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts | Learn Science at Scitable. *Nat. Educ. Knowl.* 3, 8.

Hu, Q., Liu, Y., Feng, C., Zhang, Z., Lei, Z., Shimizu, K., 2018. Predicting equilibrium time by adsorption kinetic equations and modifying Langmuir isotherm by fractal-like approach. *J. Mol. Liq.* 268, 728–733. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.113>

Huang, F., Dang, Z., Guo, C.L., Lu, G.N., Gu, R.R., Liu, H.J., Zhang, H., 2013. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmiumcontaminated soil. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 107, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.062>

Huang, L.N., Kuang, J.L., Shu, W.S., 2016. Microbial Ecology and Evolution in the Acid Mine Drainage Model System. *Trends Microbiol.* 24, 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.004>

Huber, G., Huber, H., Stetter, K.O., 1986. Isolation and Characterization of New Metal-Mobilizing Bacteria. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 16, 239–251.

Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K.D., Irizarry, R.A., Lawrence, M., Love, M.I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oles, A.K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G.K., Tenenbaum, D., Waldron, L., Morgan, M., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12, 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>

Ivey, D.M., Guffanti, A.A., Shen, Z., Kudyan, N., Krulwich, T.A., 1992. The CadC gene product of alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 partially restores NaC resistance to an *Escherichia coli* strain lacking an NaC/HC antiporter (NhaA). *J. Bacteriol.* 174, 4878–4884. <https://doi.org/10.1128/jb.174.15.4878-4884.1992>

Jacquioud, S., Cyriaque, V., Riber, L., Al-soud, W.A., Gillan, D.C., Wattiez, R., Sørensen, S.J., 2018. Long-term industrial metal contamination unexpectedly shaped diversity and activity response of sediment microbiome. *J. Hazard. Mater.* 344, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.046>

Jiang, C.Y., Liu, Y., Liu, Y.Y., You, X.Y., Guo, X., Liu, S.J., 2008. *Alicyclobacillus ferrooxydans* sp. nov., a ferrous-oxidizing bacterium from solfataric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2898–2903. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000562-0>

Jiao, S., Chen, W., Wang, E., Wang, J., Liu, Z., Li, Y., Wei, G., 2016. Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. *Sci. Rep.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep21791>

Johnson, D.B., 2003. Chemical and microbiological characteristics of mineral spoils and drainage waters at abandoned coal and metal mines. *Water, Air, Soil Pollut. Focus* 3, 47–66. <https://doi.org/10.1023/A:1022107520836>

Johnson, D.B., 2013. Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 7768–7776. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1482-7>

Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: A review. *Sci. Total Environ.* 338, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.002>

Johnson, D.B., McGinness, S., 1991. Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 207–211. <https://doi.org/10.1128/aem.57.1.207-211.1991>

Joo, J.H., Hassan, S.H.A., Oh, S.E., 2010. Comparative study of biosorption of Zn²⁺ by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 734–741. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.08.007>

Jurío, R.L., 1977. Características geoquímicas de los fluidos termales de Copahue (Neuquén - Argentina). Principales implicancias geotérmicas. Apartado de la revista “Minería”, 172, 11 pp.

Justice, N.B., Norman, A., Brown, C.T., Singh, A., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2014. Comparison of environmental and isolate *Sulfobacillus* genomes reveals diverse carbon, sulfur, nitrogen, and hydrogen metabolisms. *BMC Genomics* 15, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1107>

Kalantzakos, S., 2020. The Race for Critical Minerals in an Era of Geopolitical Realignments. *Int. Spect.* 55, 1–16. <https://doi.org/10.1080/03932729.2020.1786926>

Kan, Y., Niu, X.K., Rao, M.P.N., Dong, Z.Y., Xie, Y.G., Kang, Y.Q., Li, W.J., 2020. *Lysinibacillus cavernae* sp. nov., isolated from cave soil. *Arch. Microbiol.* 202, 1529–1534. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01852-9>

Klingl, A., Moissl-Eichinger, C., Wanner, G., Zweck, J., Huber, H., Thomm, M., Rachel, R., 2011. Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Arch. Microbiol.* 193, 867–882. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0720-y>

Kloke, J., McKean, J.W., 2014. *Nonparametric Statistical Methods Using R*, 1st ed. Chapman and Hall/CRC, Nueva York. <https://doi.org/10.1201/b17501>

Kloke, J., McKean, J.W., 2014. *Nonparametric Statistical Methods Using R*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/b17501>

Knotek-Smith, H.M., Deobald, L.A., Ederer, M., Crawford, D.L., 2003. Cadmium stress studies: Media development, enrichment, consortia analysis, and environmental relevance. *BioMetals* 16, 251–261. <https://doi.org/10.1023/A:1020617013927>

Koschorreck, M., 2008. Microbial sulphate reduction at a low pH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 329–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00482.x>

Kovacevic, Z.F., Sipos, L., Briski, F., 2000. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. *Food Technol. Biotechnol* 38, 211–216.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5112–5120. <https://doi.org/10.1128/aem.01043-13>

Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., Beiko, R.G., Huttenhower, C., 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

Lavalle, L., Chiacchiarini, P., Pogliani, C., Donati, E., 2005. Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochem.* 40, 1095–1099. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.03.008>

Le, B., Yang, S.H., 2019. Biosorption of cadmium by potential probiotic *Pediococcus pentosaceus* using in vitro digestion model. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66, 673-680. <https://doi.org/10.1002/bab.1783>

Lee, C.S., Jung, Y.T., Park, S., Oh, T.K., Yoon, J.H., 2010. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 281-328. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.013367-0>

Lee, S.M., Grass, G., Haney, C.J., Fan, B., Rosen, B.P., Anton, A., Nies, D.H., Rensing, C., 2002. Functional analysis of the *Escherichia coli* zinc transporter ZitB. *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 273-278. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00961-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00961-8)

Legendre, P., Legendre, L., 2012. *Numerical Ecology*, 3rd ed. Springer, Nueva York.

Lepš, J., Šmilauer, P., 2020. *Biostatistics with R: An Introductory Guide for Field Biologists*, 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/9781108616041>

Lewis, A.E., 2010. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy* 104, 222-234. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.06.010>

Li, H., Lin, Y., Guan, W., Chang, J., Xu, L., Guo, J., Wei, G., 2010. Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. *J. Hazard Mater.* 179, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.02.072>

Li, X., Lan, S. ming, Zhu, Z. ping, Zhang, C., Zeng, G. ming, Liu, Y. guo, Cao, W. cheng, Song, B., Yang, H., Wang, S. fan, Wu, S. hua, 2018. The bioenergetics mechanisms and applications of sulfate-reducing bacteria in remediation of pollutants in drainage: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 158, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.025>

Liang, Z., Qin, Y., Wang, P., Wang, B., Liu, Z., Yin, H., Liu, S.J., Jiang, C.Y., 2019. [Microbial community structure and function in acid mine drainage from Mengzi, Yunnan Province]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 35, 2035-2049. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.190506>

Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A., Schlegel, H.G., 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 175, 767-778. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.767-778.1993>

Lima, M.A., Urbieta, M.S., Donati, E., 2019. Arsenic-tolerant microbial consortia from sediments of Copahue Geothermal System with potential applications in bioremediation. *J. Basic Microbiol.* <https://doi.org/10.1002/jobm.201800628>

Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Auesukaree, C., 2015. Bioaccumulation and biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by bacteria isolated from a zinc mine in Thailand. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.013>

Liu, H., Song, Y., Chen, F., Zheng, S., Wang, G., 2013. *Lysinibacillus manganicus* sp. nov., isolated from manganese mining soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3568–3573. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.050492-0>

Liu, J., Chen, X., Shu, H. yue, Lin, X. rui, Zhou, Q. xing, Bramryd, T., Shu, W. sheng, Huang, L. nan, 2018. Microbial community structure and function in sediments from e-waste contaminated rivers at Guiyu area of China. *Environ. Pollut.* 235, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.008>

Liu, R., Tang, H., 1999. Removal of heavy metal from solution. *Proc. of Urban Pollut. Control Tech.*, 13–16.

Liu, T., Hou, J.H., Wang, J.B., Wang, W., Wang, X.Y., Wu, J.L., 2018. Biosorption of heavy metals from aqueous solution by the novel biosorbent *Pectobacterium* sp. ND2. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 37, 968-974. <https://doi.org/10.1002/ep.12757>

Liu, Y., Lam, M.C., Fang, H.H.P., 2001. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Sci. Technol.* 43, 59–66. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0340>

Loferer-Krössbacher, M., Klima, J., Psenner, R., 1998. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Appl Environ Microbiol.* 64, 688-694. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.688-694.1998>

Lopez Bedogni, G., Massello, F.L., Giaveno, A., Donati, E.R., Urbietta, M.S., 2020. A deeper look into the biodiversity of the extremely acidic copahue volcano-río agrio system in Neuquén, Argentina. *Microorganisms* 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010058>

Louca, S., Polz, M.F., Mazel, F., Albright, M.B.N., Huber, J.A., O'Connor, M.I., Ackermann, M., Hahn, A.S., Srivastava, D.S., Crowe, S.A., Doebeli, M., Parfrey, L.W., 2018. Function and functional redundancy in microbial systems. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 936–943. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0519-1>

Lu, W. B., Shi, J.J., Wang, C.H., Chang, J.S., 2006. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of hazardous materials* 134, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.036>

Mackintosh, M.E., 2009. Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 105, 215–218. <https://doi.org/10.1099/00221287-105-2-215>

Mahapatra N.R., B.P.C., 1996. Extreme tolerance to cadmium and high resistance to copper, nickel and zinc in different *Acidiphilium* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 393–397. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01344.x>

Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H., Paus, A., 1999. Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water research*, 33, 1347-1354. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00349-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00349-2)

Mandal, A.K., Cheung, W.D., Arguello, J.M., 2002. Characterization of a thermophilic P-type Agp/Cup-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J. Biol. Chem.* 277, 7201-7208. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109964200>

Mangold, S., Potrykus, J., Björn, E., Lövgren, L., Dopson, M., 2013. Extreme zinc tolerance in acidophilic microorganisms from the bacterial and archaeal domains. *Extremophiles* 17, 75-85. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0495-3>

Masoudzadeh, N., Zakeri, F., Lotfabad, T., bagheri Sharafi, H., Masoomi, F., Zahiri, H.S., Ahmadian, G., Noghabi, K.A., 2011. Biosorption of cadmium by *Brevundimonas* sp. ZF12 strain, a novel biosorbent isolated from hot-spring waters in high background radiation areas. *J. Hazard Mater.* 197, 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.075>

Massello, F.L., Chan, C.S., Chan, K.G., Goh, K.M., Donati, E., Urbietta, M.S., 2020. Meta-analysis of microbial communities in hot springs: Recurrent taxa and complex shaping factors beyond pH and temperature. *Microorganisms* 8, 1-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060906>

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

McMurdie, P.J., Holmes, S., 2014. Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>

Mejias Carpio, I.E., Ansari, A., Rodrigues, D.F., 2018. Relationship of Biodiversity with Heavy Metal Tolerance and Sorption Capacity: A Meta-Analysis Approach. *Environ. Sci. Technol.* 52, 184-194. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04131>

Mergeay, M., Monchy, S., Janssen, P., Houdt, R. Van, Leys, N., 2009. Megaplasmids in *Cupriavidus* Genus and Metal Resistance, in: *Microbiol. Monogr.* pp. 209-238. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85467-8_10

Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* 162, 328-334. <https://doi.org/10.1128/jb.162.1.328-334.1985>

Merino, M.P., Andrews, B.A., Parada, P., Asenjo, J.A., 2016. Characterization of *Ferroplasma acidiphilum* growing in pure and mixed culture with *Leptospirillum ferriphilum*. *Biotechnol. Prog.* 32, 1390-1396. <https://doi.org/10.1002/btpr.2340>

Merino, N., Aronson, H.S., Bojanova, D.P., Feyhl-Buska, J., Wong, M.L., Zhang, S., Giovannelli, D., 2019. Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>

Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>

Mirete, S., De Figueras, C.G., González-Pastor, J.E., 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6001–6011. <https://doi.org/10.1128/AEM.00048-07>

Miwa, H., Ahmed, I., Yokota, A., Fujiwara, T., 2009. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1427–1432. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65455-0>

Monhemius, A.J., 1977. Precipitation Diagrams for Metal Hydroxides, Sulphides, Arsenates and Phosphates. *Trans. Inst. Min. Metall. Sect. C Miner. Process. Extr. Metall.* 86.

Monod, J., 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 3, 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>

Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P.J., Janssen, A., Coninx, I., Mergeay, M., Leys, N., 2011. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *BioMetals* 24, 1133–1151. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9473-y>

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J.M., Couce, M.L., Cocho, J.A., 2013. A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Mol. Genet. Metab.* 110, 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.024>

Mori, A.S., Furukawa, T., Sasaki, T., 2013. Response diversity determines the resilience of ecosystems to environmental change. *Biol. Rev.* 88, 349–364. <https://doi.org/10.1111/brv.12004>

Mullapudi, S., Siletzky, R.M., Kathariou, S., 2010. Diverse cadmium resistance determinants in *Listeria monocytogenes* isolates from the Turkey processing plant environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 627–630. <https://doi.org/10.1128/AEM.01751-09>

Muñoz, A.J., Espínola, F., Ruiz, E., 2018. Removal of heavy metals by *Klebsiella* sp. 3S1. Kinetics, equilibrium and interaction mechanisms of Zn(II) biosorption. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 93, 1370–1380. <https://doi.org/10.1002/jctb.5503>

Nanda, M., Kumar, V., Sharma, D.K., 2019. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to ‘clean-up’ heavy metal contaminants from water. *Aquat. Toxicol.* 212, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011>

Navarro, C.A., Orellana, L.H., Mauriaca, C., Jerez, C.A., 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6102–6109. <https://doi.org/10.1128/AEM.00308-09>

Navarro, C.A., von Bernath, D., Jerez, C.A., 2013. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: Importance for biomining and bioremediation. *Biol. Res.* 46, 363–371. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000400008>

Nguyen, H.T., Nguyen, H.L., Nguyen, M.H., Nguyen, T.K.N., Dinh, H.T., 2020. Sulfate reduction for bioremediation of amd facilitated by an indigenous acidand metal-Tolerant sulfate-reducer. *J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1005–1012. <https://doi.org/10.4014/jmb.2001.01012>

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.3.548-572.2000>

Nicolaus, B., Improta, R., Manca, M. C., Lama, L., Esposito, E., Gambacorta, A., 1998. Alicyclobacilli from an unexplored geothermal soil in Antarctica: Mount Rittmann. *Polar Biol* 19, 133–141. <https://doi.org/10.1007/s003000050224>

Nielsen, U.N., Ayres, E., Wall, D.H., Bardgett, R.D., 2011. Soil biodiversity and carbon cycling: A review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *Eur. J. Soil Sci.* 62, 105–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x>

Nies, D.H., 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* 27, 17–28. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(92\)90003-s](https://doi.org/10.1016/0147-619x(92)90003-s)

Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>

Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00048-2)

Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E., Ruiz-Berraquero, F., 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2385–2390. <https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2385-2390.1989>

Nunes, I., Jacquiod, S., Brejnrod, A., Holm, P.E., Johansen, A., Brandt, K.K., Priemé, A., Sørensen, S.J., 2016. Coping with copper: Legacy effect of copper on potential activity of soil bacteria following a century of exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/iw175>

Nuñez, H., Covarrubias, P.C., Moya-Beltrán, A., Issotta, F., Atavales, J., Acuña, L.G., Johnson, D.B., Quatrini, R., 2016. Detection, identification and typing of *Acidithiobacillus* species and strains: a review. *Res. Microbiol.* 167, 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.05.006>

Nuñez, H., Moya-Beltrán, A., Covarrubias, P.C., Issotta, F., Cárdenas, J.P., González, M., Atavales, J., Acuña, L.G., Johnson, D.B., Quatrini, R., 2017. Molecular systematics of the Genus *Acidithiobacillus*: Insights into the phylogenetic structure and diversification of the taxon. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00030>

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H., 2019. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-6. <https://github.com/vegandevs/vegan>

Orell, A., Navarro, C.A., Rivero, M., Aguilar, J.S., Jerez, C.A., 2012. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles* 16, 573–583. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0457-9>

Orellana, R., Macaya, C., Bravo, G., Dorochesi, F., Cumsille, A., Valencia, R., Rojas, C., Seeger, M., 2018. Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation. *Front. Microbiol.* 9, 1–25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>

Oves, M., Khan, M.S., Zaidi, A., 2013. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi J. Biol. Sci.* 20, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.006>

Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., Güven, K., 2009. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub. sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.041>

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2014. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 42, D737–D743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1252>

Pan, J., Ge, X., Liu, R., Tang, H., 2006. Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb (II) ions by AFM and FT-IR, *Colloids Surf. B* 52, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.016>

Pan, J.H., Liu, R.X., Tang, H.X., 2007. Surface reaction of *Bacillus cereus* biomass and its biosorption for lead and copper ions. *J. Environ. Sci.* 19, 403-408. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60067-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60067-9)

Panarello, H.O., 2002. Características isotópicas y termodinámicas de reservorio del campo geotérmico Copahue-Caviahue, provincia del Neuquén. *Rev. la Asoc. Geol. Argentina* 57, 328-340.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 26-32. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1843-z>

Parmar, T.K., Rawtani, D., Agrawal, Y.K., 2016. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Front. Life Sci.* 9, 110-118. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>

Pedrozo, F.L., Diaz, M.M., Temporetti, P.F., Baffico, G.D., Beamud, S.G., 2010. Características limnológicas de un sistema ácido: Río Agrío-Lago Caviahue, Provincia del Neuquén, Argentina. *Ecol. Austral* 20, 173-184.

Petersen, J., 2016. Heap leaching as a key technology for recovery of values from low-grade ores - A brief overview. *Hydrometallurgy* 165, 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2015.09.001>

Pinnell, L.J., Turner, J.W., 2019. Shotgun metagenomics reveals the benthic microbial community response to plastic and bioplastic in a coastal marine environment. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01252>

Pirt, S.J., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 163, 224-231. <https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0069>

Pogliani, C., Donati, E., 2000. Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans*: Importance of jarosite precipitation. *Process Biochem.* 35, 997-1004. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00135-7)

Postgate, J.R., 1984. *The Sulfate-Reducing Bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Poulsen, H.V., Willink, F.W., Ingvorsen, K., 2016. Aerobic and anaerobic cellulase production by *Cellulomonas uda*. *Arch. Microbiol.* 198, 725-735. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1230-8>

Priyadarshane, M., Das, S., 2021. Biosorption and removal of toxic heavy metals by metal tolerating bacteria for bioremediation of metal contamination: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 104686. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104686>

Quehenberger, J., Shen, L., Albers, S.V., Siebers, B., Spadiut, O., 2017. *Sulfolobus* - A potential key organism in future biotechnology. *Front. Microbiol.* 8, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02474>

R Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena. <https://www.R-project.org/>

Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., Fava, F., 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>

Rae, T.D., Schmidt, P.J., Pufahl, R.A., Culotta, V.C. and O'Halloran, T.V., 1999. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284, 805-808. <https://doi.org/10.1126/science.284.5415.805>

Rambabu, K., Banat, F., Pham, Q.M., Ho, S.H., Ren, N.Q., Show, P.L., 2020. Biological remediation of acid mine drainage: Review of past trends and current outlook. *Environ. Sci. Ecotechnology* 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2020.100024>

Rasoulnia, P., Barthen, R., Lakaniemi, A.M., 2021. A critical review of bioleaching of rare earth elements: The mechanisms and effect of process parameters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 51, 378–427. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1727718>

Raveendran, S., Palaninathan, V., Nagaoka, Y., Fukuda, T., Iwai, S., Higashi, T., Mizuki, T., Sakamoto, Y., Mohanan, P.V., Maekawa, T., Kumar, D.S., 2015. Extremophilic polysaccharide nanoparticles for cancer nanotherapy and evaluation of antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 76, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.001>

Rawlings, D.E., Johnson, D.B., 2007. *Biomining*, 1st ed. Springer, Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-34911-2>

Rawlings, D.E., Johnson, D.B., 2007. The microbiology of biomining: Development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* 153, 315–324. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001206-0>

Ren, Y., Chen, S.Y., Yao, H.Y., Deng, L.J., 2015. *Lysinibacillus cresolivorans* sp. nov., a m-cresol-degrading bacterium isolated from coking wastewater treatment aerobic sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4250–4255. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000569>

Rensing, C., Pribyl, T., Nies, D.H., 1997. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton-antiporter. *J. Bacteriol.* 179, 6871–6879. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.6871-6879.1997>

Rensing, C., Sun, Y., Mitra, B., Rosen, B.P., 1998. Pb(II)-translocating P-type ATPases. *J. Biol. Chem.* 273, 32614–32617. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32614>

Reuter, J.A., Spacek, D.V., Snyder, M.P., 2015. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol. Cell* 58, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>

Ribeiro do Carmo, J.R., Pimenta, C.J., da Silva, J.F., de Souza, S.M.C., 2013. Recovery of copper (II) absorbed in biomass of *Cladosporium cladosporioides*. *Sci. Agric.* 70, 147–151. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000300002>

Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., Gillan, D.C., 2014. Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environ. Pollut.* 189, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.02.031>

Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/35059215>

Rutgers, M., Van't Verlaat, I.M., Wind, B., Posthuma, L., Breure, A.M., 1998. Rapid method for assessing pollution-induced community tolerance in contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2210–2213. <https://doi.org/10.1002/etc.5620171111>

Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., 2013. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>

Sagova-Mareckova, M., Boenigk, J., Bouchez, A., Cermakova, K., Chonova, T., Cordier, T., Eisendle, U., Elsersek, T., Fazi, S., Fleituch, T., Frühe, L., Gajdosova, M., Graupner, N., Haegerbaeumer, A., Kelly, A.M., Kopecky, J., Leese, F., Nöges, P., Orlic, S., Panksep, K., Pawlowski, J., Petrussek, A., Piggott, J.J., Rusch, J.C., Salis, R., Schenk, J., Simek, K., Stovicek, A., Strand, D.A., Vasquez, M.I., Vrålstad, T., Zlatkovic, S., Zupancic, M., Stoeck, T., 2021. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Res.* 191, 116767. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116767>

Sakil Munna, M., Tahera, J., Mohibul Hassan Afrad, M., Nur, I.T., Noor, R., 2015. Survival of *Bacillus* spp. SUBB01 at high temperatures and a preliminary assessment of its ability to protect heat-stressed *Escherichia coli* cells. *Microbiology. BMC Res. Notes* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1631-9>

Salehizadeh, H., Shojaosadati, S.A., 2003. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Res.* 37, 4231–4235. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00418-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00418-4)

Sánchez-Andrea, I., Sanz, J.L., Bijmans, M.F.M., Stams, A.J.M., 2014. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage. *J. Hazard. Mater.* 269, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.032>

Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G., Schippers, A., 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59, 159–175. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00180-8)

Sati, M., Verma, M., Rai, J.P.N., 2014. Biosorption of heavy metals from single and multimetal solutions by free and immobilized cells of *Bacillus megaterium*. *Int. J. Adv. Res.* 2, 923–934.

Sayers, E.W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K.D., Karsch-Mizrachi, I., 2020. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 48, D84–D86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz956>

Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., Willscher, S., 2014. Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 141, 1–47. https://doi.org/10.1007/10_2013_216

Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 319–321. <https://doi.org/10.1128/aem.65.1.319-321.1999>

Schmidt, T., Schlegel, H.G., 1989. Nickel and cobalt resistance of various bacteria isolated from soil and highly polluted domestic and industrial wastes. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 315–328. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90014-1](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90014-1)

Schmidt, T., Schlegel, H.G., 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc Locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* 176, 7045–7054. <https://doi.org/10.1128/jb.176.22.7045-7054.1994>

Schocke, L., Bräsen, C., Siebers, B., 2019. Thermoacidophilic *Sulfolobus* species as source for extremozymes and as novel archaeal platform organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 59, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.012>

Scott, J.S., Smith, P.G., 1981. *Dictionary of Waste and Water Treatment*. Butterworths, Londres.

Sedlakova-Kadukova, J., Kopcakova, A., Gresakova, L., Godany, A., Pristas, P., 2019. Bioaccumulation and biosorption of zinc by a novel *Streptomyces* K11 strain isolated from highly alkaline aluminium brown mud disposal site. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.123>

Sensfuss, C., Schlegel, H.G., 1988. Plasmid pMOL28-encoded resistance to nickel is due to specific efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* 55, 295–298. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02817.x>

Shade, A., 2017. Diversity is the question, not the answer. *ISME J.* 11, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.118>

Sheng, G.P., Yu, H.Q., Li, X.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>

Sheng, X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2007. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *J. Colloid Interface Sci.* 310, 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.01.084>

Sheng, X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *J. Colloid Interface Sci.* 321, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.038>

Silver, S., Phung, L.T., 1996. BACTERIAL HEAVY METAL RESISTANCE: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 753–789. <https://doi.org/doi:10.1146/annurev.micro.50.1.753>

Silver, S., Phung, L.T., 2005. A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 587–605. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0019-6>

Singh, B.K., Quince, C., Macdonald, C.A., Khachane, A., Thomas, N., Al-Soud, W.A., Sørensen, S.J., He, Z., White, D., Sinclair, A., Crooks, B., Zhou, J., Campbell, C.D., 2014. Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. *Environ. Microbiol.* 16, 2408–2420. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12353>

Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C., Montfort, W.R., 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 7815–7817. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7815-7817.2004>

Smith, K., Novick, R.P., 1972. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 112, 761–772. <https://doi.org/10.1128/jb.112.2.761-772.1972>

Snyder, J.C., Spuhler, J., Wiedenheft, B., Roberto, F.F., Douglas, T., Young, M.J., 2004. Effects of culturing on the population structure of a hyperthermophilic virus. *Microb. Ecol.* 48, 561–566. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0246-9>

Solovieva, I.M., Entian, K.D., 2002. Investigation of the *yvgW* *Bacillus subtilis* chromosomal gene involved in Cd²⁺ ion resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 208, 105–109. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11068.x>

Soucy, S.M., Huang, J., Gogarten, J.P., 2015. Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* 16, 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>

Stefanowicz, A.M., Niklińska, M., Laskowski, R., 2008. Metals Affect Soil Bacterial and Fungal Functional. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 591–598. <https://doi.org/10.1897/07-288.1>

Stefanowicz, A.M., Niklińska, M., Laskowski, R., 2009. Pollution-induced tolerance of soil bacterial communities in meadow and forest ecosystems polluted with heavy metals. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.05.005>

Sun, D.-L., Jiang, X., Wu, Q.L., Zhou, N.-Y., 2013. Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5962–5969. <https://doi.org/10.1128/aem.01282-13>

Sutcliffe, B., Chariton, A.A., Harford, A.J., Hose, G.C., Greenfield, P., Elbourne, L.D.H., Oytam, Y., Stephenson, S., Midgley, D.J., Paulsen, I.T., 2017. Effects of uranium concentration on microbial community structure and functional potential. *Environ. Microbiol.* 19, 3323–3341. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13839>

Tabaraki, R., Ahmady-Asbchin, S., Abdi, O., 2013. Biosorption of Zn(II) from aqueous solutions by *Acinetobacter* sp. isolated from petroleum spilled soil. *J. Environ. Chem. Eng.* 1, 604–608. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.06.024>

Tansel, B., 2017. From electronic consumer products to e-wastes: Global outlook, waste quantities, recycling challenges. *Environ. int.* 98, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.10.002>

Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. *Mol. Clin. Environ. Toxicol.* 101, 133–164. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>

Thukral, A.K., 2017. A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agric. Res. J.* 54, 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146x.2017.00001.1>

Tipayno, S.C., Truu, J., Samaddar, S., Truu, M., Preem, J.K., Oopkaup, K., Espenberg, M., Chatterjee, P., Kang, Y., Kim, K., Sa, T., 2018. The bacterial community structure and functional profile in the heavy metal contaminated paddy soils, surrounding a nonferrous smelter in South Korea. *Ecol. Evol.* 8, 6157–6168. <https://doi.org/10.1002/ece3.4170>

Trevors, J.T., Oddie, K.M., Belliveau, B.H., 1985. Metal resistance in bacteria 32, 39–54.

Tully, D.B., Collins, B.J., Overstreet, J.D., Smith, C.S., Dinse, G.E., Mumtaz, M.M., Chapin, R.E., 2000. Effects of Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead on Gene Expression Regulated by a Battery of 13 Different Promoters in Recombinant HepG2 Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 79–90. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.9014>

Ullrich, S.R., González, C., Poehlein, A., Tischler, J.S., Daniel, R., Schlömann, M., Holmes, D.S., Mühlhling, M., 2016. Gene loss and horizontal gene transfer contributed to the genome evolution of the extreme acidophile “ferrovum.” *Front. Microbiol.* 7, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00797>

Urbieta M.S., Lima A., Massello F.L., Bedogni G.L., 2021. Exploring Microbial Diversity and Heavy Metals Resistance in an Active Volcanic Geothermal System, in: *Extreme Environments*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429343452-5>

Urbieta, M., Porati, G., Segretín, A., González-Toril, E., Giaveno, M., Donati, E., 2015. Copahue Geothermal System: A Volcanic Environment with Rich Extreme Prokaryotic Biodiversity. *Microorganisms* 3, 344–363. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3030344>

Urbieta, M.S., 2013. Diversidad Microbiana en Ambientes Volcánicos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/30890>

Urbieta, M.S., Donati, E.R., Chan, K.G., Shahar, S., Sin, L.L., Goh, K.M., 2015. Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.007>

Urbieta, M.S., González-Toril, E., Bazán, Á.A., Giaveno, M.A., Donati, E., 2015. Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquén, Argentina). *Extremophiles* 19, 437–450. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0729-2>

Urbieta, M.S., Lima, M.A., Massello, F.L., Lopez Bedogni, G., Giaveno, M.A., Donati E.R., 2021. Exploring Microbial Diversity and Heavy Metals Resistance in an Active Volcanic Geothermal System. En: *Extreme Environments*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 89-100.

Urbieta, M.S., Rascovan, N., Vázquez, M.P., Donati, E., 2017. Genome analysis of the thermoacidophilic archaeon *Acidianus copahuensis* focusing on the metabolisms associated to biomining activities. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3828-x>

Urbieta, M.S., Toril, E.G., Alejandra Giaveno, M., Bazán, Á.A., Donati, E.R., 2014. Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.012>

Valdes, J., Quatrini, R., Hallberg, K., Dopson, M., Valenzuela, P.D.T., Holmes, D.S., 2009. Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J. Bacteriol.* 191, 5877–5878. <https://doi.org/10.1128/JB.00843-09>

Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>

van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Sci. Total Environ.* 406, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.050>

Varekamp, J.C., 2004. Copahue volcano: A modern terrestrial analog for the opportunity landing site? *Eos, Trans. Am. Geophys. Union* 85, 401. <https://doi.org/10.1029/2004EO410002>

Varekamp, J.C., Ouimette, A.P., Herman, S.W., Flynn, K.S., Bermudez, A., Delpino, D., 2009. Naturally acid waters from Copahue volcano, Argentina. *Appl. Geochemistry* 24, 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.11.018>

Varley, J.A., Chin, P.Y., 1970. Determination of water-soluble sulphate in acidic sulphate soils by atomic-absorption spectroscopy. *Analyst* 95, 592-595. <https://doi.org/10.1039/AN9709500592>

Veglió, F., Beolchini, F., Gasbarro, A., 1997. Biosorption of toxic metals: An equilibrium study using free cells of *Arthrobacter* sp. *Process Biochem.* 32, 99-105. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00047-7)

Veneu, D.M., Torem, M.L., Pino, G.A.H., 2013. Fundamental aspects of copper and zinc removal from aqueous solutions using a *Streptomyces lunalinhaesii* strain. *Miner. Eng.* 48, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.11.015>

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Francesco, V. Di, Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.-R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z.Y., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M.-H., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S.C., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.-H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigó, R., Campbell, M.J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.-H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A.D., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A.,

Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X., 2001. The Sequence of the Human Genome. *Science* (80-.). 291, 1304–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

Villafane, A., Voskoboynik, Y., Ruhl, I., Sannino, D., Maezato, Y., Blum, P., Bini, E., 2011. CopR of *Sulfolobus solfataricus* represents a novel class of archaeal-specific copper-responsive activators of transcription. *Microbiology* 157, 2808–2817. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051862-0>

Villafane, A.A., Voskoboynik, Y., Cuebas, M., Ruhl, I., Bini, E., 2009. Response to excess copper in the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 385, 67–71. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bbrc.2009.05.013>

Volesky, B., 1990. *Biosorption of heavy metals*, 1st ed. CRC Press, Boca Ratón.

Volesky, B., 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59, 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00160-2)

Wang, D., Hosteen, O., Fierke, C.A., 2012. ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *J. Inorg. Biochem.* 111, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.02.008>

Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* 27, 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>

Wang, X., Chen, M., Xiao, J., Hao, L., Crowley, D.E., Zhang, Z., Yu, J., Huang, N., Huo, M., Wu, J., 2015. Genome sequence analysis of the naphthenic acid degrading and metal resistant bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3. *PLoS One* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132881>

Wang, Y., Naumann, U., Wright, S.T., Warton, D.I., 2012. Mvabund- an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods Ecol. Evol.* 3, 471–474. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00190.x>

Warton, D.I., Wright, S.T., Wang, Y., 2012. Distance-based multivariate analyses confound location and dispersion effects. *Methods Ecol. Evol.* 3, 89–101. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00127.x>

Wase, D.A.J., Forster, C.F., Ho, Y.S., 1997. Low-cost biosorbents: batch processes. En: *Biosorbents for Metal Ions*. Taylor & Francis, Gran Bretaña, pp.141–163.

Weiss, S., Xu, Z.Z., Peddada, S., Amir, A., Bittinger, K., Gonzalez, A., Lozupone, C., Zaneveld, J.R., Vázquez-Baeza, Y., Birmingham, A., Hyde, E.R., Knight, R., 2017. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome* 5, 27. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0237-y>

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, Nueva York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Williams, A.G., Coleman, G.S., 1992. *The Rumen Protozoa*, 1st ed. Springer-Verlag, Nueva York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2776-2>

Willis, G., Hedrich, S., Nancuqueo, I., Johnson, D.B., Donati, E.R., 2013. Microbial Diversity in Acidic Anaerobic Sediments at the Geothermal Caviahue-Copahue System, Argentina. *Adv. Mater. Res.* 825, 7-10. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.825.7>

Willis, G., Nancuqueo, I., Hedrich, S., Giaveno, A., Donati, E., Johnson, D.B., 2019. Enrichment and isolation of acid-tolerant sulfate-reducing microorganisms in the anoxic, acidic hot spring sediments from Copahue volcano, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz175>

Willis, G., Yaakop, A.S., Chan, C.S., Urbieta, M.S., Chan, K.G., Ee, R., Tan-Guan-Sheng, A., Goh, K.M., Donati, E.R., 2016. Draft genome sequence of the sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum copahuensis* strain CINDEFI1 isolated from the geothermal Copahue system, Neuquén, Argentina. *Genome Announc.* 4, 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00870-16>

Willis, G.P., 2016. *Biorremediación de metales pesados por sulfidogénesis utilizando comunidades y microorganismos sulfato-reductores*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53085>

Xiong, W., Zeng, Z., Zhang, Y., Ding, X., Sun, Y., 2015. Fate of metal resistance genes in arable soil after manure application in a microcosm study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.026>

Xu, S., Xing, Y., Liu, S., Hao, X., Chen, W., Huang, Q., 2020. Characterization of Cd²⁺ biosorption by *Pseudomonas* sp. strain 375, a novel biosorbent isolated from soil polluted with heavy metals in Southern China. *Chemosphere* 240, 124893. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124893>

Yan, X., Luo, X., Zhao, M., 2016. Metagenomic analysis of microbial community in uranium-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 299-310. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7003-5>

Yin, H., Niu, J., Ren, Y., Cong, J., Zhang, Xiaoxia, Fan, F., Xiao, Y., Zhang, Xian, Deng, J., Xie, M., He, Z., Zhou, J., Liang, Y., Liu, X., 2015. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Sci. Rep.* 5, 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep14266>

Zeng, W., Li, F., Wu, C., Yu, R., Wu, X., Shen, L., Liu, Y., Qiu, G., Li, J., 2020. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* sp. S3 to multiple heavy metals. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 43, 153–167. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02213-7>

Zhang, R., Hedrich, S., Jin, D., Breuker, A., Schippers, A., 2021. *Sulfobacillus harzensis* sp. Nov., an acidophilic bacterium inhabiting mine tailings from a polymetallic mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004871>

Zhang, X., Liu, X., Liang, Y., Guo, X., Xiao, Y., Ma, L., Miao, B., Liu, H., Peng, D., Huang, W., Zhang, Y., Yin, H., 2017. Adaptive Evolution of Extreme Acidophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Potentially Driven by Horizontal Gene Transfer and Gene Loss. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03098-16>

Zhao, M., Xu, Y., Zhang, C., Rong, H., Zeng, G., 2016. New trends in removing heavy metals from wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6509–6518. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7646-x>

Zhou, H., Zhang, R., Hu, P., Zeng, W., Xie, Y., Wu, C., Qiu, G., 2008. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. *J. Appl. Microbiol.* 105, 591–601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03807.x>

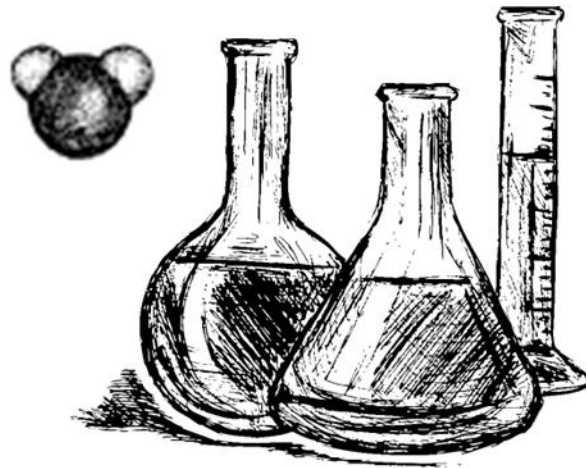
Zhou, J.L., Huang, P.L., Lin, R.G., 1998. Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Env. Pol.* 101, 67–75. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00034-7)

Ziller, A., Fraissinet-Tachet, L., 2018. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics* 10, 1549–1559. <https://doi.org/10.1039/c8mt00165k>



ANEXO I

Determinaciones analíticas



Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica con llama es un método analítico para la determinación cuantitativa de elementos químicos basado en la absorción de la radiación óptica (luz) por parte de átomos libres en estado fundamental. Para ello, un haz de luz se dirige a través de una llama (en la cual la muestra es volatilizada y el elemento atomizado) hacia un monocromador y sobre un detector que mide la cantidad de luz absorbida (**Figura A1.1**).

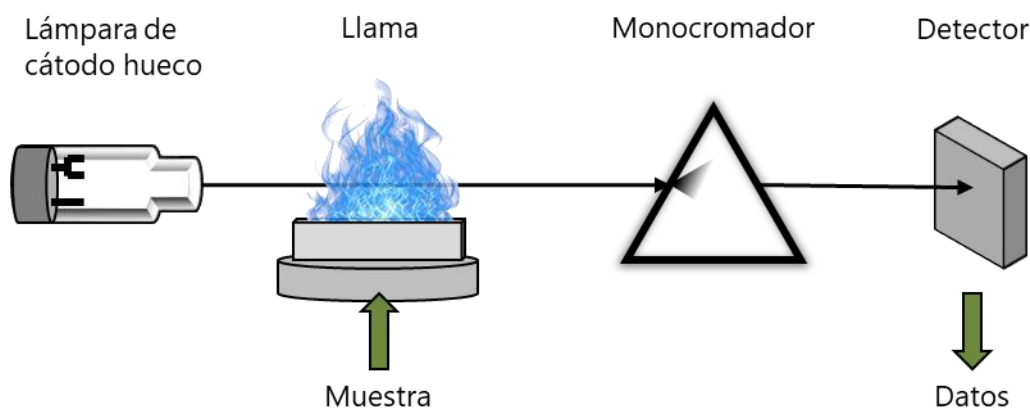


Figura A1.1 – Esquema de la espectroscopía de absorción atómica de llama.

En la determinación de metales, como cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, se utiliza como fuente luminosa una lámpara de cátodo hueco del mismo elemento que se desea medir. Luego se selecciona la primera línea de resonancia, que es la que conduce al primer estado excitado; esto proporciona un método sensible y relativamente libre de interferencias espectrales o de radiación.

Cuando se analizan muestras acuosas, la misma es aspirada, nebulizada y transformada en un aerosol que luego se mezcla con los gases de la combustión (aire-acetileno u óxido nitroso-acetileno). La mezcla es pasada entonces al quemador en donde se forma la llama, allí, la muestra es volatilizada y atomizada formando un vapor atómico. Al pasar un haz de luz monocromático (de la

longitud de onda correspondiente a la primera línea de resonancia del elemento a medir) a través de la llama, los átomos libres, que se encuentran en el estado fundamental, pueden pasar al primer estado excitado absorbiendo la luz incidente. Como resultado de la absorción, la intensidad de la luz decrecerá en forma proporcional a la concentración de átomos del elemento en la llama, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

En este trabajo de tesis, para las determinaciones de metales, se construyeron curvas de calibración a partir de soluciones preparadas en HNO₃ (0,14 N) utilizando patrones comerciales de los metales correspondientes (Chem-Lab Analytical, Bélgica).

A continuación (**Tabla A1.1**) se indican las condiciones específicas para la determinación de cada uno de los metales estudiados. En todas ellas, se utilizaron lámparas de cátodo hueco Photron (Photron Pty, Australia) del elemento correspondiente. En los casos en que se ejecutó corrección de fondo, la misma se realizó con una lámpara de deuterio (D2). La llama se generó usando acetileno como combustible y aire como oxidante. Todas las determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu AA-6650 (Shimadzu, Japón).

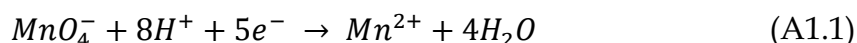
Tabla A1.1 – Condiciones específicas para la determinación de los metales estudiados

Metal	Longitud de onda (nm)	Corrección de fondo	Corriente de lámpara (mA)	Ranura (nm)	Flujo (L/min)	Límite de detección (mg/L)	Rango de calibración (mg/L)
Cd	228,8	Sí	8	1,0	1,8	0,002	1,00-25,00
Co	240,7	Sí	12	0,2	1,6	0,03	1,00-25,00
Cu	324,8	Sí	6	0,5	1,8	0,01	1,00-25,00
Ni	232,0	Sí	12	0,2	1,6	0,02	1,00-25,00
Zn	213,9	Sí	8	0,5	2,0	0,005	0,50-25,00
Fe	248,3	Sí	12	0,2	2,2	0,02	0,50-50,00
Ba	553,5	No	16	0,2	2,0	0,03	50,00-500

Permanganometría

La permanganometría es una técnica cuantitativa que consiste en una titulación redox utilizando el ion permanganato (MnO_4^-). Dependiendo de la concentración de protones de la solución, el ion Mn(VII) puede reducirse a su estado +6, +4, +2, cediendo 1, 3 o 5 electrones, respectivamente. Esta técnica puede utilizarse para la detección y cuantificación de Fe(II), Mn(II), $C_2O_4^{2-}$, NO_2^- y H_2O_2 . En este trabajo de tesis sólo se utilizó para la determinación de hierro ferroso en cultivos de concentración inicial de ~ 4 g/L.

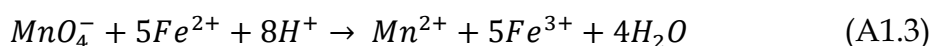
La determinación de Fe(II) se realiza en condiciones muy acidas en las cuales ocurre la siguiente semirreacción (**ecuación A1.1**):



El potencial normal de reducción de esta reacción es +1,51 V, por lo cual, es posible acoplar a ella la oxidación de hierro ferroso ($E^0_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} = +0,77$ V) (**ecuación A1.2**):



Siendo la ecuación global del proceso redox (**ecuación A1.3**):



La solución patrón de permanganato se preparó a partir de la sal $KMnO_4$, disolviendo 0,32 g en ~ 500 mL de agua destilada con agregado de unas gotas de H_2SO_4 . La solución fue llevada a ebullición durante al menos una hora, tras lo cual, fue llevada a volumen de 1 L con agua acidificada y hervida durante la misma cantidad de tiempo, y almacenada en un frasco color caramelo.

El patrón de permanganato se tituló luego utilizando sulfato de amonio y hierro(II) (sal de Mohr). Para ello, se pesó una cantidad conocida de sal de Mohr que fue disuelta en agua destilada con agregado de H_2SO_4 en exceso. Utilizando una bureta, se agregaron gotas del patrón de permanganato a la solución hasta observar cambio de color (de translúcido a rosado/púrpura). Este procedimiento se repitió al menos cinco veces. La normalidad del patrón de MnO_4^- se calculó de

acuerdo con la siguiente ecuación (**ec. A1.4**), donde m_s es la masa de sal de Mohr pesada (en gramos), PM_s su peso molecular (392,14 g/mol) y V_{Mn} el volumen de permanganato gastado (en litros).

$$N_{Mn} = \frac{m_s}{V_{Mn} PM_s} \quad (\text{A1.4})$$

Para las determinaciones de Fe(II), 1 mL de muestra se depositó en erlenmeyers con agregado de ~20 mL de agua destilada y ~3 mL de H₂SO₄. La mezcla se tituló luego con el patrón de permanganato.

La concentración molar de Fe(II) en la muestra se calculó de la siguiente manera (**ec. A1.5**):

$$M_{Fe} = N_{Mn} \cdot \frac{V_{Mn}}{V_{Fe}} \quad (\text{A1.5})$$

Donde N_{Mn} es la normalidad del patrón de permanganato utilizado, V_{Mn} el volumen gastado en la titulación y V_{Fe} el volumen de muestra en la mezcla (1 mL).

Determinación de Fe(II) por el método colorimétrico de la o-fenantrolina

La determinación espectrofotométrica de hierro(II) utilizando o-fenantrolina ofrece mayor sensibilidad que la titulación redox con permanganato y permite determinar concentraciones diluidas del metal (hasta 10 µg/L).

Este método se fundamenta en la reacción del Fe(II) con la o-fenantrolina para formar un complejo de coloración anaranjada que absorbe luz a 510 nm en forma proporcional a su concentración –en ciertas condiciones–, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

El procedimiento utilizado en este trabajo de tesis consistió en la preparación de una solución de o-fenantrolina disolviendo 100 mg de la sal monohidratada en agua destilada con agregado de dos gotas de HCl (10 M). La solución se llevó a 100 mL de volumen final utilizando un matraz aforado.

Por otro lado, se preparó buffer acetato de amonio pesando 250 g de la sal en un vaso de precipitados. Luego, en campana para gases, la sal se disolvió añadiendo 150 mL de agua destilada y 700 mL de ácido acético glacial manteniendo agitación magnética. Finalmente, la solución se transvasó a frasco color caramelo.

Por último, se preparó una solución patrón de hierro(II) para construir la curva de calibración del método colorimétrico. Para ello, 0,350 g de sal de Mohr ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O) fueron disueltos en 100 mL de agua destilada con el añadido de dos gotas de HCl (10 M) (la solución se llevó a volumen utilizando un matraz aforado). De esta manera se obtuvo una solución patrón 500 mg/L de Fe(II).

Todos los reactivos antes descriptos se prepararon en el momento de la determinación.

La determinación se realizó en placas de ELISA de 96 pocillos. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo (volúmenes por muestra a evaluar) 8 μL de buffer, 8 μL de o-fenantrolina y 174 μL de agua destilada. Se alicuotaron 190 μL de mezcla de reacción en cada pocillo y se agregaron 10 μL de muestra. Cada muestra se determinó por triplicado (es decir, en tres pocillos). Una vez iniciada la reacción, se incubó durante 15 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro de microplacas Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, EEUU).

Para realizar la curva de calibración se prepararon siete diluciones del patrón de 500 mg/L de Fe(II) en 1 mL volumen final de la misma mezcla de reacción antes descrita, abarcando el rango de 1-10 mg/L. Cada concentración se preparó por triplicado y, tras 15 minutos de incubación en oscuridad, se alicuotó por triplicado en una placa de ELISA. Finalmente, se determinó la absorbancia a 510 nm.

Recuento celular

Los recuentos celulares se realizaron utilizando un microscopio Nikon Labophot (Nikon, Japón) para contraste de fases, y una cámara de recuento Petroff-Hausser (Hausser-Scientific, EEUU). Esta cámara de recuento posee 1/50 mm de profundidad y cuenta con una grilla *Improved Neubauer* de 1/400 mm² de área de celda unitaria (**Figura A1.2**).

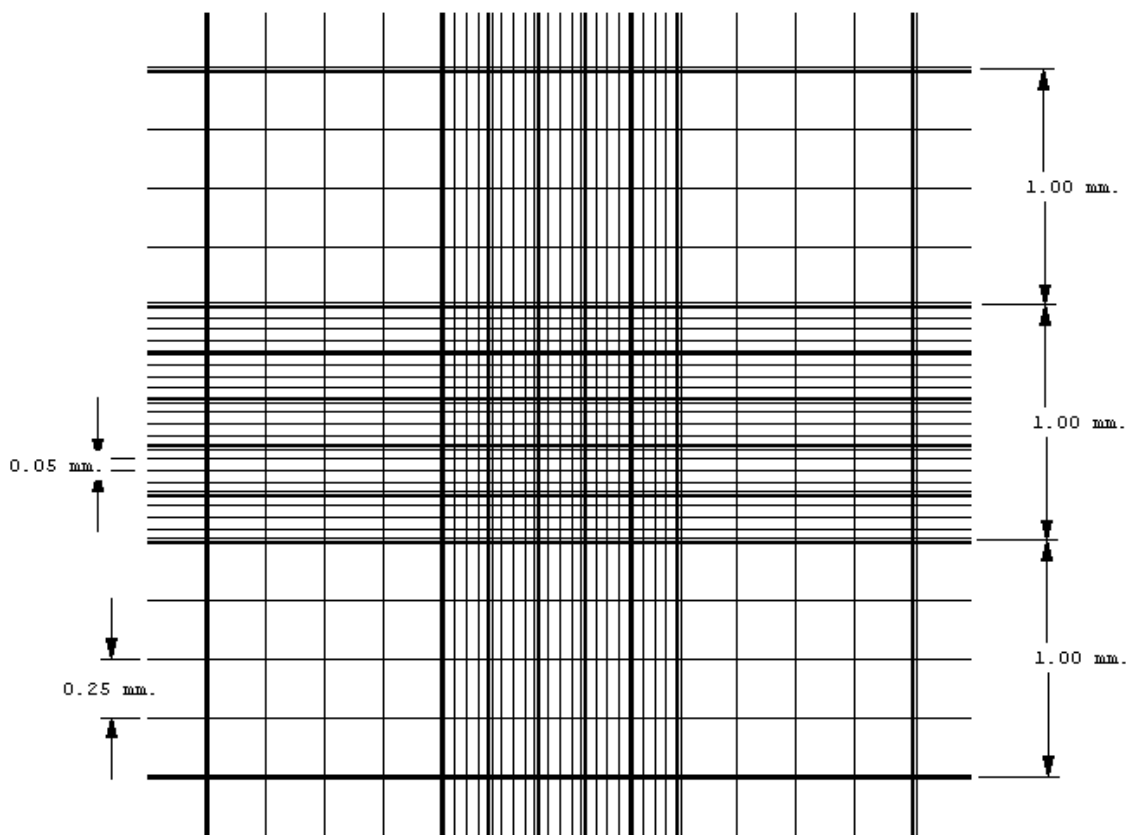


Figura A1.2 - Grilla de recuento Neubauer Improved.

El recuento se llevó a cabo sobre el cuadrante central de 1,00 mm² de dos maneras diferentes (**Figura A1.3**). Un primer recuento rápido consistió en el conteo de las 20 celdas de 0,0025 mm² (1/400 mm²) en la diagonal mayor del cuadrante de 1,00 mm² (flecha verde). En un segundo recuento, se contaron las 16 celdas de cinco cuadrantes de 0,04 mm² no lindantes y tomados al azar (en naranja se indica un cuadrante de 0,04 mm² con 16 celdas).

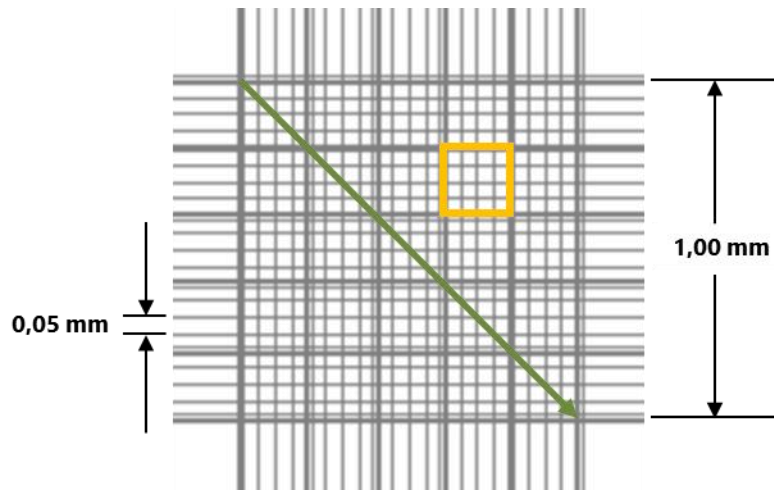


Figura A1.3 – Técnicas de recuento utilizadas sobre el cuadrante central de la grilla. En verde, el recuento rápido de la diagonal mayor (20 celdas), y en naranja, un cuadrante de 16 celdas de los cuales se contaron 5 tomados al azar.

Para calcular la concentración de células se utilizó la **ecuación A1.6**, donde n_T es el número total de microorganismos contados (suma de todas las celdas), n_{celdas} es el número de celdas de $0,0025 \text{ mm}^2$ contadas (20 en la metodología de la diagonal mayor y 80 en la metodología de los cinco cuadrantes), V_{celda} es el volumen de una celda ($1/50 \text{ mm} \cdot 0,0025 \text{ mm}^2 = 5 \times 10^{-5} \text{ mm}^3 = 5 \times 10^{-8} \text{ mL}$) y F_{dil} el factor de dilución de la muestra.

$$Cél/ml = \frac{n_T}{n_{celdas} \cdot V_{celda}} F_{dil} \quad (A1.6)$$

El factor de dilución fue escogido de forma tal que se contasen 5-10 células por celda de $0,0025 \text{ mm}^2$.

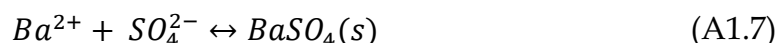
Los valores obtenidos en cada técnica fueron promediados entre sí. En caso de que los resultados fueran considerablemente disímiles, se repitieron ambos recuentos cargando la cámara con un nuevo volumen de muestra. No obstante, a lo largo de todo el trabajo de tesis, los resultados obtenidos a través del método rápido fueron similares a los obtenidos por el método de 5 cuadrantes.

Determinación de sulfato por precipitación con BaCl₂

La metodología para la determinación de sulfato fue desarrollada en este trabajo de tesis a partir de lo reportado por Varley & Chin (1970).

Los métodos más recurrentes para la determinación de sulfato en soluciones acuosas son la turbidimetría y la gravimetría, ambas determinaciones están sujetas a muchos errores (tanto positivos como negativos), presentan baja reproducibilidad – sobre todo cuando las muestras contienen otros iones – y son engorrosas de realizar cuando se tiene un gran número de muestras. Por estas razones, se decidió desarrollar un método alternativo de mayor reproducibilidad y facilidad de procesamiento.

En una solución acuosa con contenido de sulfato, la adición de BaCl₂ genera la formación de sulfato de bario (pK_{ps}=10) según la siguiente reacción (ec. A1.7):



Esta reacción es rápida a temperatura ambiente y forma un precipitado blanco cristalino. A temperaturas mayores (pero menores a 100°C) se obtienen cristales más grandes y de mayor pureza.

Ante un exceso de bario, el equilibrio se desplaza hacia la precipitación prácticamente completa del sulfato quedando un remanente de bario en solución. La concentración de bario remanente soluble puede ser determinada luego por espectroscopía de absorción atómica (ver apartado correspondiente). Conociendo la cantidad de Ba(II) agregada y la cantidad remanente tras la reacción de precipitación es posible determinar la cantidad de sulfato presente en la muestra de acuerdo con el siguiente balance de masas (en moles) (ec. A1.8):

$$SO_4^{2-} = Ba_{agregado}^{2+} - Ba_{remanente}^{2+} \quad (A1.8)$$

El método fue probado, en primera instancia, utilizando diluciones de concentración conocida de sulfato en agua destilada. Para ello, 9,577 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ fueron disueltos en agua destilada y llevados a 1 L en matraz aforado. De esta manera, se obtuvo una solución patrón 3500 mg/L de sulfato. A partir de esta solución patrón, se prepararon diluciones de (en mg/L de SO_4^{2-}) 2500, 1750, 1000, 700, 500 y 350. Cada dilución fue preparada por triplicado.

Por otro lado, se preparó una solución patrón de Ba(II) pesando 1,067 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un vaso de precipitados y disolviendo con agua destilada en agitación magnética. La disolución se llevó a 100 mL de volumen final en matraz aforado y se transvasó a un frasco color caramelo. Se obtuvo, así, una solución 6000 mg/L de Ba(II).

Se dispuso 1 mL de cada dilución de sulfato en un tubo de 2 mL y se añadió 1 mL de la solución patrón de Ba(II). Los tubos se mezclaron por inversión (observándose la formación del compuesto insoluble al instante) y se dejaron en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, los tubos fueron centrifugados a 12 000 g durante 10 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante de cada tubo y se diluyó en 5 mL de HNO_3 (0,14 N) (dilución 1:6). La dilución fue filtrada por membrana de 0,45 μm de diámetro de poro. El mismo día se determinó la concentración de Ba por espectroscopía de absorción atómica.

La concentración de sulfato, a partir de la concentración de bario remanente, se calculó de la siguiente manera (ec. A1.9):

$$[\text{SO}_4^{2-}] = \left\{ \frac{[\text{Ba}^{2+}]_P}{F_{D_Ba}} - [\text{Ba}^{2+}]_D \right\} * \frac{PM_{\text{SO}_4}}{PM_{\text{Ba}}} * F_{D_SO_4} \quad (\text{A1.9})$$

Donde $[\text{Ba}^{2+}]_P$ es la concentración del patrón de bario utilizado (en este caso, 6000 mg/L), $[\text{Ba}^{2+}]_D$ es la concentración (en mg/L) determinada por espectroscopía (corregida por la dilución en ácido nítrico), F_{D_Ba} el factor de dilución para el patrón de bario y $F_{D_SO_4}$ el factor de dilución de la muestra en la mezcla de reacción BaCl_2 -Muestra (en este ensayo, como se agregó 1 mL de cada parte, el factor de dilución es 2 en ambos casos), PM_{SO_4} el peso molecular del sulfato (96,06), y PM_{Ba} el del bario (137,327). El factor encerrado entre llaves

corresponde a la concentración de bario soluble remanente en la mezcla de reacción, mientras que el segundo factor es la relación estequiométrica sulfato-bario corregida por el factor de dilución de la muestra.

La **Tabla A1.2** muestra los resultados obtenidos. Se indica la concentración de sulfato patrón, la concentración de bario remanente calculada (si la concentración de sulfato fuese la del patrón), la concentración de bario determinada por absorción atómica, la concentración de sulfato estimada a partir ella según la **ecuación A1.9**, el promedio del triplicado de estas últimas y su respectiva desviación estándar.

Tabla A1.2 – Resultados obtenidos durante la prueba de calibración. Concentraciones en mg/L

Factor dilución	[SO ₄ ²⁻] Patrón	[Ba ²⁺] Calculado	[Ba ²⁺] Determinado	[SO ₄ ²⁻] Estimado	[SO ₄ ²⁻] Promedio	DE
1	3500	498,21	478,57	3527,47		
1	3500	498,21	450,55	3566,67	3537	26
1	3500	498,21	486,42	3516,50		
1,4	2500	1213,00	1158,88	2575,72		
1,4	2500	1213,00	1130,86	2614,92	2583	30
1,4	2500	1213,00	1172,33	2556,90		
2	1750	1749,10	1658,75	1876,41		
2	1750	1749,10	1637,45	1906,20	1899	20
2	1750	1749,10	1631,85	1914,04		
3,5	1000	2285,20	2239,31	1064,21		
3,5	1000	2285,20	2263,96	1029,71	1088	74
3,5	1000	2285,20	2163,09	1170,83		
5	700	2499,64	2512,78	681,63		
5	700	2499,64	2541,92	640,86	680	38
5	700	2499,64	2488,12	716,12		
7	500	2642,60	2557,61	618,91		
7	500	2642,60	2602,44	556,19	574	39
7	500	2642,60	2609,16	546,78		
10	350	2749,82	2734,69	371,17		
10	350	2749,82	2667,44	465,25	393	64
10	350	2749,82	2754,86	342,95		
0	0	3000,00	3057,47	-80,40		
0	0	3000,00	2965,57	48,17	35	110
0	0	3000,00	2901,68	137,54		

Figura A1.4 muestra la recta identidad entre la concentración de sulfato patrón (de acuerdo con la dilución) y la concentración estimada a partir de la concentración de bario remanente. La línea punteada representa la función identidad de pendiente 1 y ordenada al origen 0.

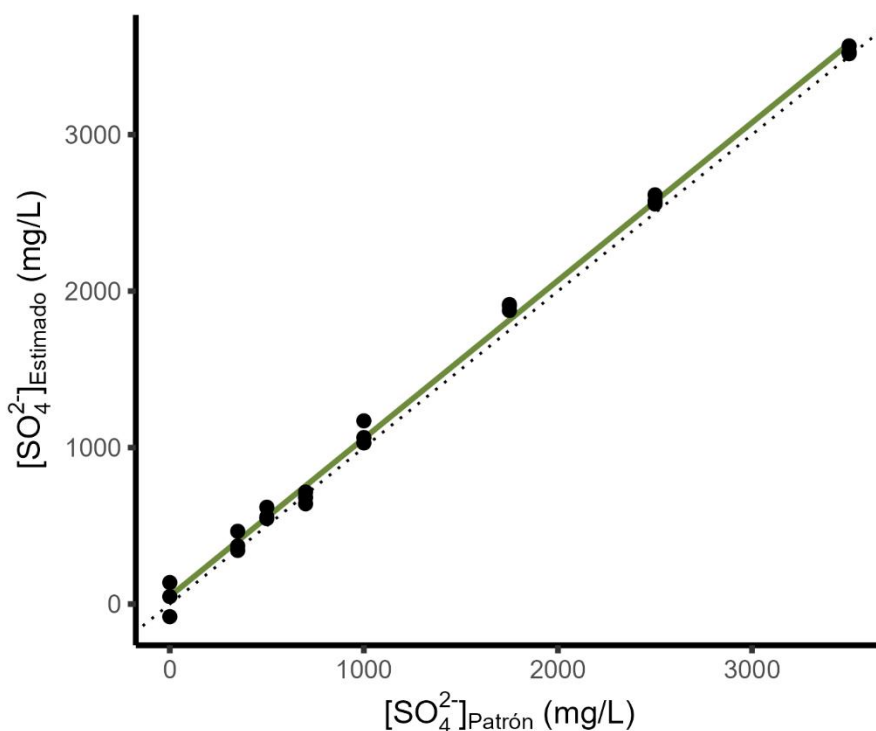


Figura A1.4 – Recta identidad entre la concentración de sulfato agregada y la determinada según el método desarrollado. En línea punteada la función identidad (pendiente=1, ordenada al origen=0).

El análisis de regresión para la recta obtenida indica una pendiente de 1,009 y un valor de R^2 de 0,997.

Se realizó luego una segunda evaluación del método, en este caso, analizando una matriz compleja con contenido de sulfato. Para ello, se utilizó el medio de cultivo Postgate B (Postgate, 1984), frecuentemente usado para el cultivo de microorganismos sulfato-reductores, el mismo contiene ~1800 mg/L de SO_4^{2-} (Tabla A1.3). Dado que el contenido de sulfato es inferior al del ensayo anterior, se preparó una solución patrón de Ba(II) de menor concentración (3000 mg/L). El procedimiento para la evaluación fue idéntico al antes descripto.

Tabla A1.3 – Composición del medio Postgate B (en g/L)

KH ₂ PO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1
CaSO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
Lactato de Sodio	3,5
Extracto de levadura	1
FeSO ₄	0,5
Ac. Ascórbico	0,1
Ac. Tioglicólico	0,1
pH	7-7,5

La **Figura A1.5** muestra la recta identidad obtenida para las concentraciones de sulfato estimadas según la determinación de bario remanente y la agregada de acuerdo con la dilución del patrón.

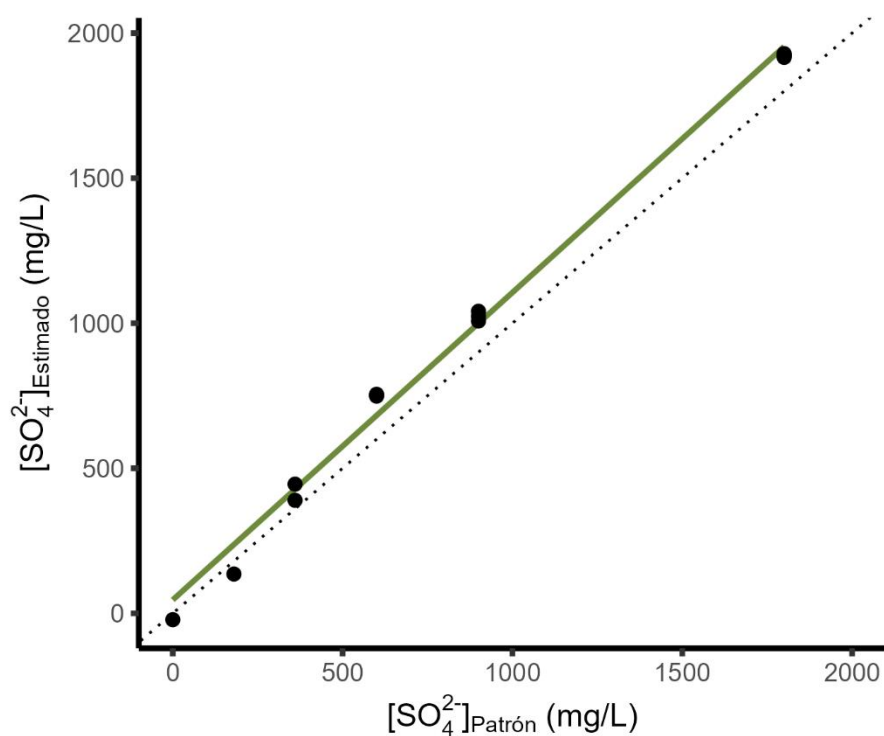


Figura A1.5 – Recta identidad entre la concentración de sulfato agregada y la determinada a partir del bario remanente en solución. En línea punteada la función identidad.

El análisis de regresión, en este caso, arrojó un valor de pendiente de 1,06 y un coeficiente de regresión $R^2 = 0,992$.



ANEXO II

***Recopilación bibliográfica de
concentraciones inhibitorias
mínimas de los metales estudiados***



La concentración inhibitoria mínima (CIM) está definida como la concentración más baja de un tóxico que genera inhibición del crecimiento en un microorganismo determinado. Usualmente, este valor se utiliza como parámetro para definir la sensibilidad o resistencia hacia ese compuesto tóxico. En este trabajo de tesis, para comparar las tolerancias exhibidas por los consorcios, se utilizó la revisión bibliográfica realizada por Mejías Carpio *et al.* (2017) y se realizó una recopilación propia para valores de CIM de cobalto. Los datos recopilados se encuentran en la **Tabla A2.1**.

Las **Figuras A2.1** y **A2.2** muestran la distribución de los datos para cada metal, en cada caso se indica el valor de la mediana, la moda y el número de datos recopilados (*n*).

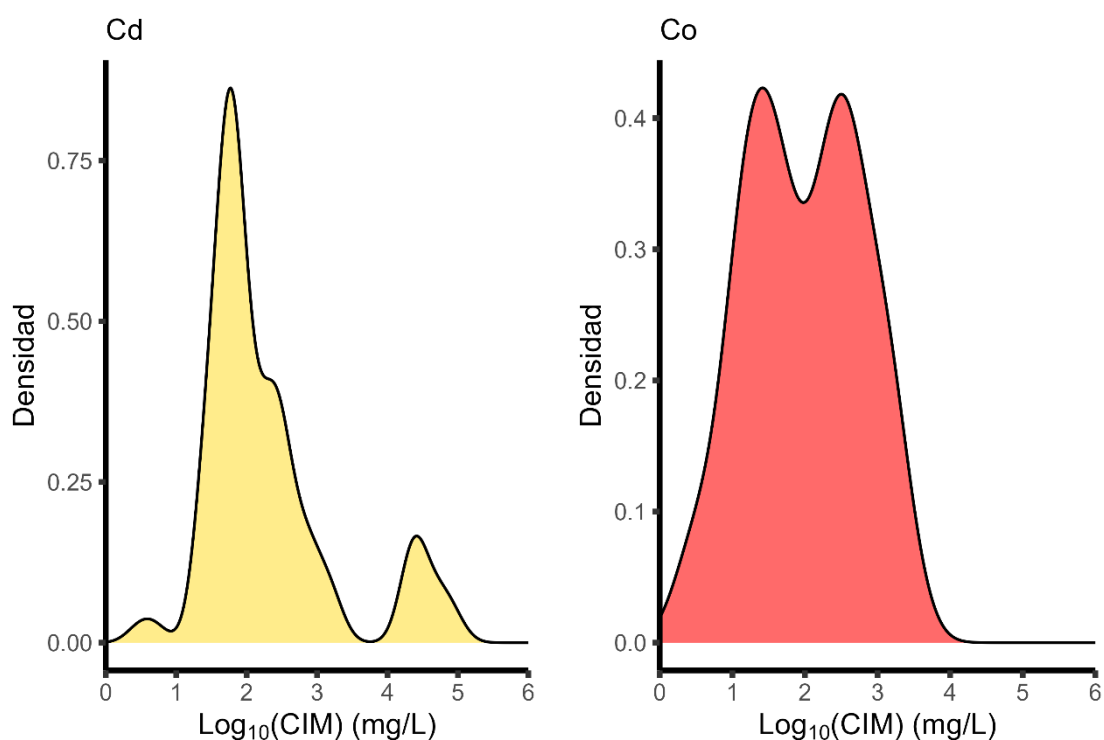


Figura A2.1 - Distribución de las CIM reportadas para cadmio (mediana=84,3 mg/L; moda=56,2 mg/L, *n*=96) y cobalto (mediana=117,87 mg/L; *n*=71).

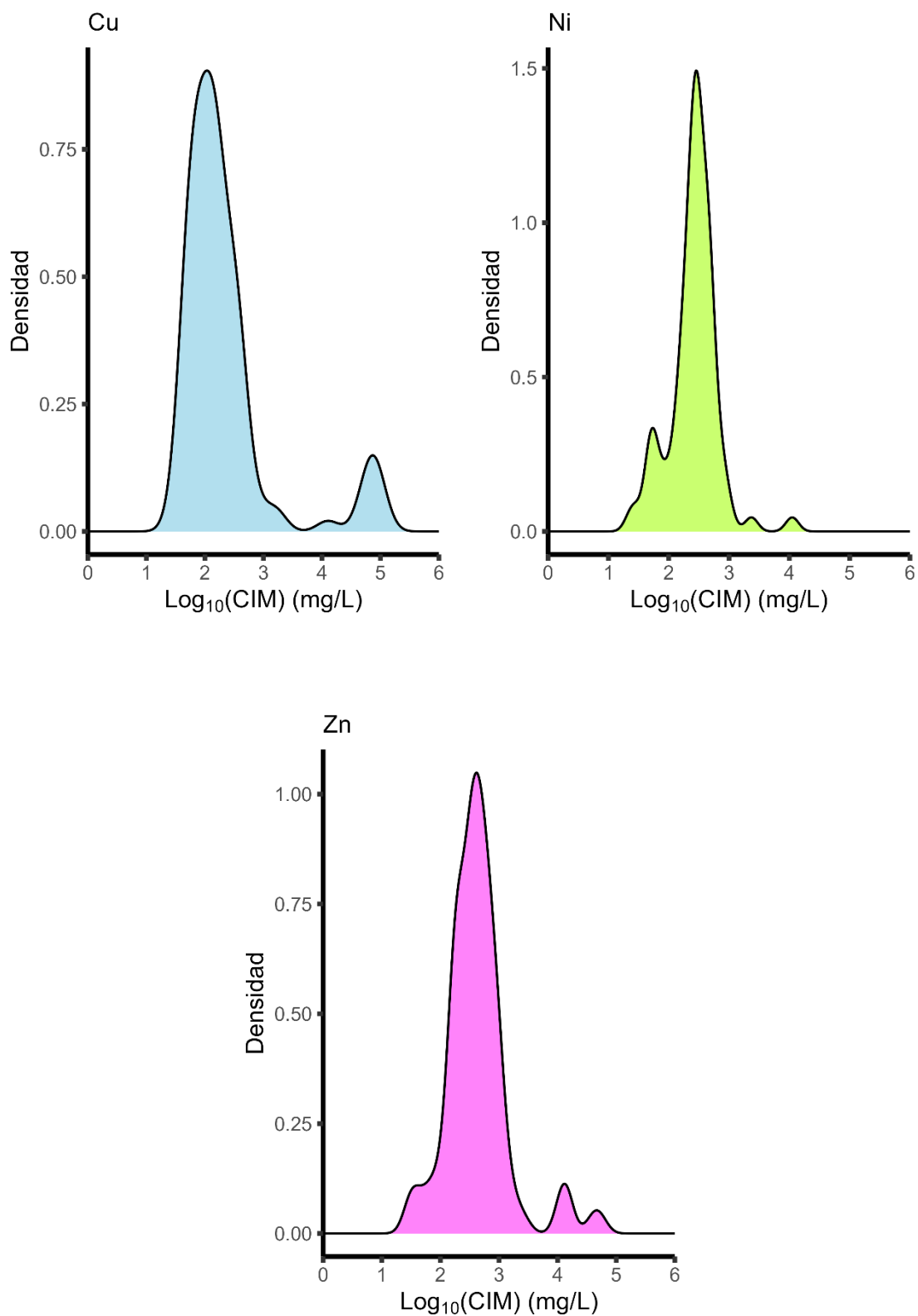


Figura A2.2 - Distribución de las CIM reportadas para cobre (mediana=158,85 mg/L; moda=158,85 mg/L; n=104), níquel (mediana=293,45 mg/L; moda=293,45 mg/L; n=82) y zinc (mediana=392,28 mg/L; moda=326,90 mg/L; n=103).

Tabla A2.1 – Datos recopilados (valores de CIM en mg/L)

Referencia	Género ¹⁴	Metal	CIM
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	562,05
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	281,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cd	170,86
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	899,28
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	25,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	168,62
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	168,62
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	67446,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	22482,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	22482,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	168,62
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	22482,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	22482,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	22482,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cd	400,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cd	78,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	42716,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	1600,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	224,82
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	112,41
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	112,41
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	112,40
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	449,64
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cd	30,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cd	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cd	89928,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	84,30

¹⁴ En el caso de tratarse de cultivos puros

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	281,02
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	281,02
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	84,30
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	843,07
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	281,02
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	84,30
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	281,02
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	84,30
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	112,41
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	281,02
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	281,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	84,30
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	281,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	56,20
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cd	28,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cd	1500,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	1600,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	5,00

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cd	3,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cd	28103,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cd	28103,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cd	56205,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	562,05
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	449,64
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	281,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cd	80,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	786,87
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cd	247,28
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cd	112,40
Liesegang <i>et al.</i> , 1993	<i>Ralstonia</i>	Co	29,47
Liesegang <i>et al.</i> , 1993	<i>Ralstonia</i>	Co	29,47
Liesegang <i>et al.</i> , 1993	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Liesegang <i>et al.</i> , 1993	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1994	<i>Ralstonia</i>	Co	1178,66
Schmidt & Schlegel, 1994	<i>Ralstonia</i>	Co	1473,33
Schmidt & Schlegel, 1994	<i>Ralstonia</i>	Co	1178,66
Monsieurs <i>et al.</i> , 2011	<i>Cupriavidus</i>	Co	1473,33
Nies, 1999	<i>Escherichia</i>	Co	58,93
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	707,20
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	442,00
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	442,00
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	442,00
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	294,67
Schmidt & Schlegel, 1989	<i>Ralstonia</i>	Co	1178,66
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	2357,33
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	442,00
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	2357,33
Schmidt & Schlegel, 1989		Co	1178,66
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	17,68
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	589,33
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	176,80
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	17,68
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	589,33
Grass <i>et al.</i> , 2000	<i>Ralstonia</i>	Co	589,33
Mergeay <i>et al.</i> , 1985	<i>Ralstonia</i>	Co	294,67
Mergeay <i>et al.</i> , 1985	<i>Ralstonia</i>	Co	1178,66

Mergeay <i>et al.</i> , 1985	<i>Ralstonia</i>	Co	4,13
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Escherichia</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Bacillus</i>	Co	2,95
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Streptococcus</i>	Co	2,95
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Streptococcus</i>	Co	2,95
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Staphylococcus</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	35,36
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	47,15
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Pseudomonas</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Providencia</i>	Co	23,57
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Providencia</i>	Co	35,36
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Proteus</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Proteus</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Proteus</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Proteus</i>	Co	11,79
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Aeromonas</i>	Co	35,36
Hassen <i>et al.</i> , 1998	<i>Citrobacter</i>	Co	11,79
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Chromobacterium</i>	Co	147,33
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Delaya</i>	Co	147,33
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Flavobacterium</i>	Co	58,93
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Halomonas</i>	Co	147,33
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Halomonas</i>	Co	147,33
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Marinococcus</i>	Co	29,47
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Marinococcus</i>	Co	58,93
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Micrococcus</i>	Co	58,93
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Micrococcus</i>	Co	58,93
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Paracoccus</i>	Co	58,93
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Pseudomonas</i>	Co	147,33
Nieto <i>et al.</i> , 1989	<i>Sporosarcina</i>	Co	58,93
Wang <i>et al.</i> , 2015	<i>Cupriavidus</i>	Co	117,87
Wang <i>et al.</i> , 2015	<i>Cupriavidus</i>	Co	1473,33
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	100,00

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	317,70
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cu	275,76
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	381,28
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	1600,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cu	300,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	76255,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	101,67
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	63546,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	76255,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	12709,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	76255,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	95319,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	50837,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	95319,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cu	111,19
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cu	400,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cu	1600,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cu	800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Cu	317,73
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	381,24
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	381,24
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	381,24
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	381,24
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	95,31
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	190,64
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	127,08
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Cu	125,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	31,77
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	317,70
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	317,70
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	47,65
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	317,70
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	63,54
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Cu	158,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	600,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	127,09
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	127,09
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	63546,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Cu	127,09
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	127,09
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	190,62
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	285,93
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	381,24

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Cu	101,66
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Cu	222,39
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	381,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	381,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	349,25
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Cu	317,50
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Ni	800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	88,03
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	410,85
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Ni	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Ni	73,36
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Ni	11152,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	234,76
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	234,76
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	234,76
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	2347,60
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	234,76
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	58,96
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	235,84
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	235,84
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	235,84
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	471,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	471,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	471,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	471,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	471,68
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	763,01
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Ni	29,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	146,72

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	146,70
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	58,69
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	146,72
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	146,72
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	146,72
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	586,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	146,72
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	586,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	586,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	440,17
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Ni	293,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Ni	1000,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	176,07
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	469,52
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Ni	23,47
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Ni	176,07
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	400,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	2615,20

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	400,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	50,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	200,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	1046,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	523,04
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	523,04
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	523,04
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	392,28
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	100,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	98,07
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	98,07
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	65,38
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	13076,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	13076,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	52304,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	32,69
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	13076,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	13076,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Zn	1800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	41189,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018		Zn	457,66
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	1569,10
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14

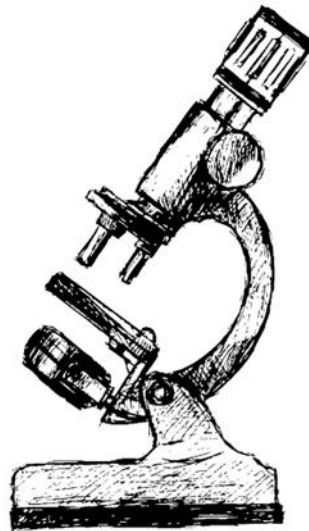
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	196,14
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	392,28
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	784,56
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Zn	65,40
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	653,80
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	653,80
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Paenibacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	653,80
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	163,45
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35

Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	817,25
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	326,90
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus</i>	Zn	490,35
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Zn	800,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	523,04
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Zn	32,69
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Klebsiella</i>	Zn	32,69
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Pseudomonas</i>	Zn	653,80
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ralstonia</i>	Zn	653,80
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Ochrobactrum</i>	Zn	210,00
Mejias Carpio <i>et al.</i> , 2018	<i>Cupriavidus</i>	Zn	653,80



ANEXO III

Cinéticas de crecimiento



Consortrios organótrofos aeróbicos

En los consorcios organótrofos aeróbicos se determinó la variación en la densidad óptica (DO) a 600 nm y la variación de pH.

La densidad óptica puede relacionarse con la velocidad de crecimiento (μ) de acuerdo con la **ecuación (A3.1)**:

$$\ln(DO) = \ln(K) + \ln(X_0) + \mu t \quad (\text{A3.1})$$

Donde K es una constante relacionada a la absortividad de la muestra y el camino óptico, y X_0 es la concentración de células al tiempo inicial.

La ecuación A3.1 es una recta durante el crecimiento exponencial con pendiente igual a μ_{Max} . Para calcular la fase de latencia (*lag*), se intersecó la recta pendiente con la recta obtenida del promedio de los puntos que se observaron sin variación a la izquierda de la recta pendiente.

La **Tabla A3.1** muestra un resumen de los valores determinados para los consorcios organótrofos aeróbicos de ambas muestras.

Tabla A3.1 - Parámetros de crecimiento de consorcios organótrofos aeróbicos

Consortrio	DO (600 nm)		
	Lag (h)	μ (h^{-1})	R ² adj
SAoSM	0,58	0,468	0,93
SAoCd	2,29	0,177	0,97
SAoCo	2,21	0,187	0,99
SAoCu	1,99	0,200	0,99
SAoNi	2,75	0,094	0,96
SAoZn	1,07	0,140	0,97
ALoSM	5,16	0,173	0,97
ALoCd	14,36	0,088	0,97
ALoCo	16,58	0,065	0,98
ALoCu	13,42	0,110	0,96
ALoNi	9,78	0,144	0,99
ALoZn	8,67	0,096	0,99

Todas las cinéticas fueron realizadas por triplicado. Los gráficos fueron realizados utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) en R. En los gráficos se muestra el promedio de los triplicados y las barras de error correspondiente, las curvas que conectan los puntos tienen una finalidad representativa. Los cultivos inoculados y los controles abióticos se graficaron en azul y en gris, respectivamente. Todas las representaciones de un mismo parámetro se muestran con igual escala sobre el eje *y* para facilitar la comparación entre consorcios de un mismo origen.

ALoSM

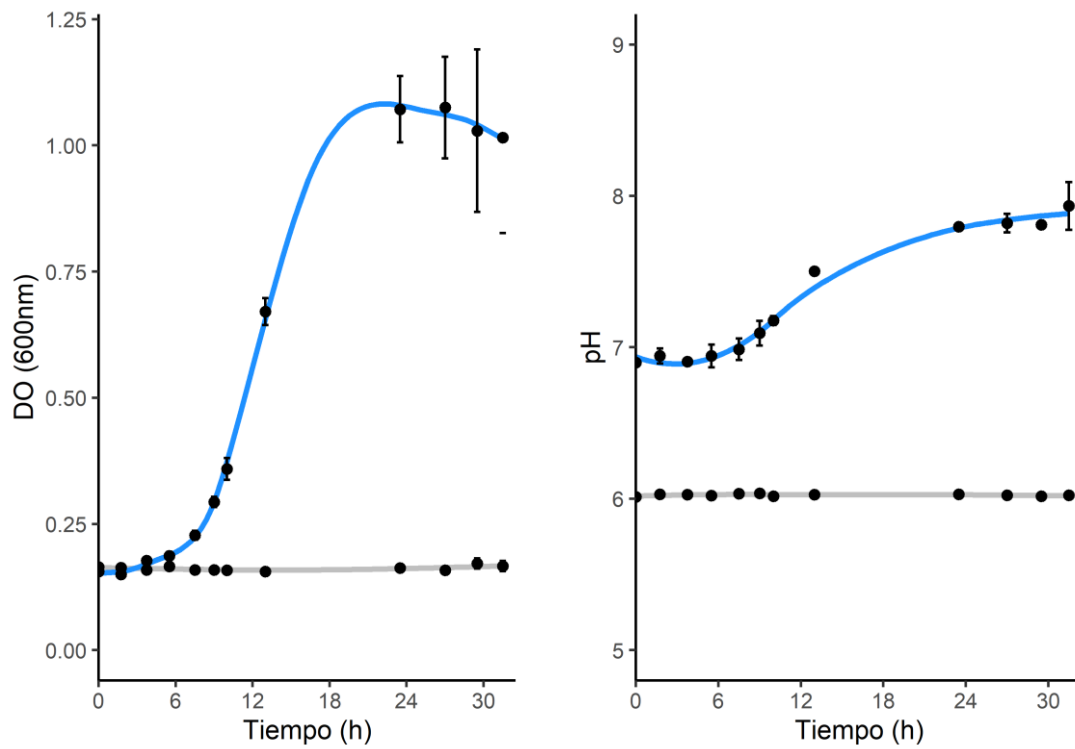


Figura A3.1 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

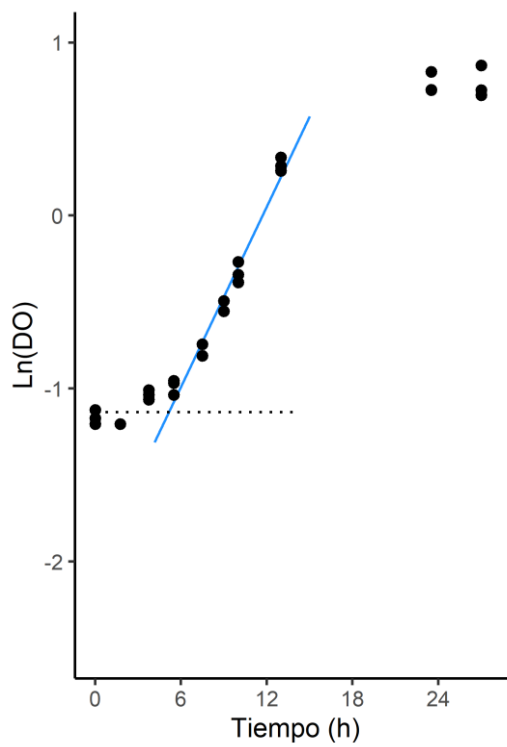


Figura A3.2 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$; Lag = 5,16 h; $R^2_{ajustado} = 0,97$.

ALoCd

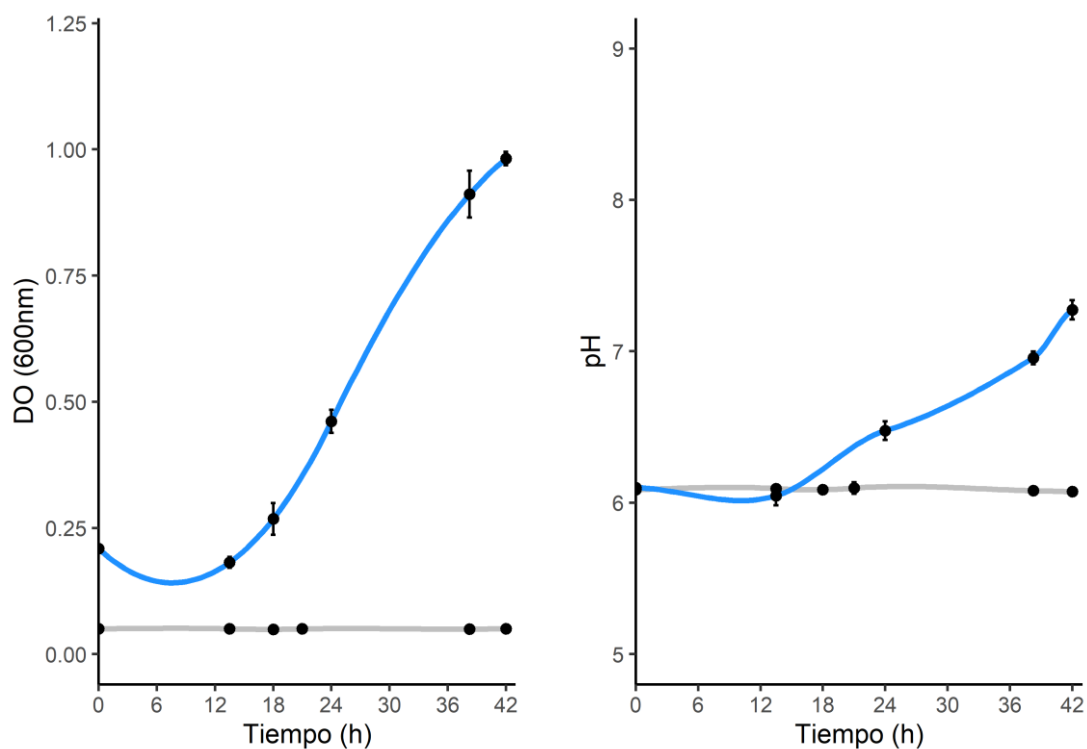


Figura A3.3 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

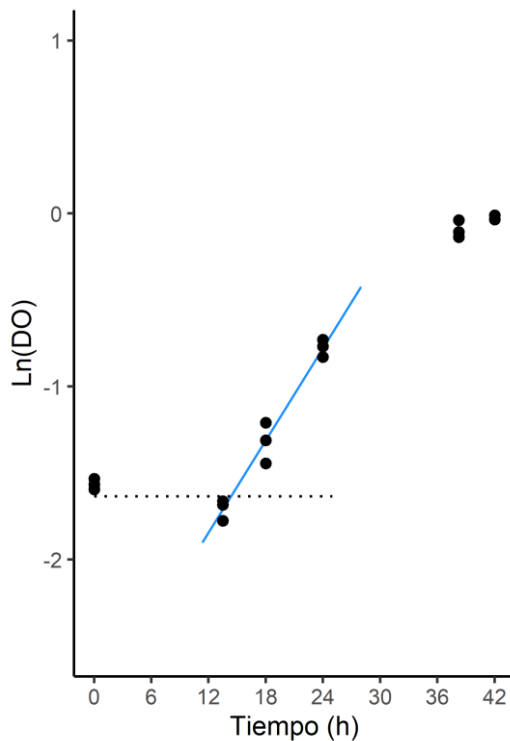


Figura A3.4 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$; Lag = 14,36 h; $R^2_{ajustado} = 0,97$.

ALoCo

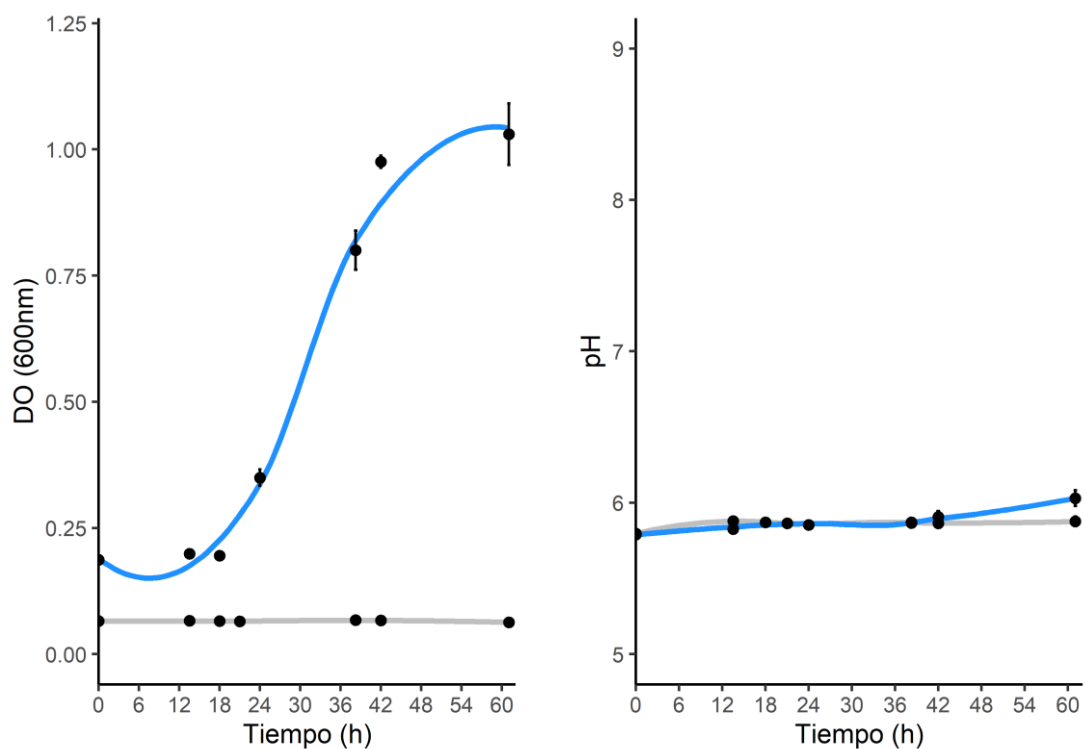


Figura A3.5 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

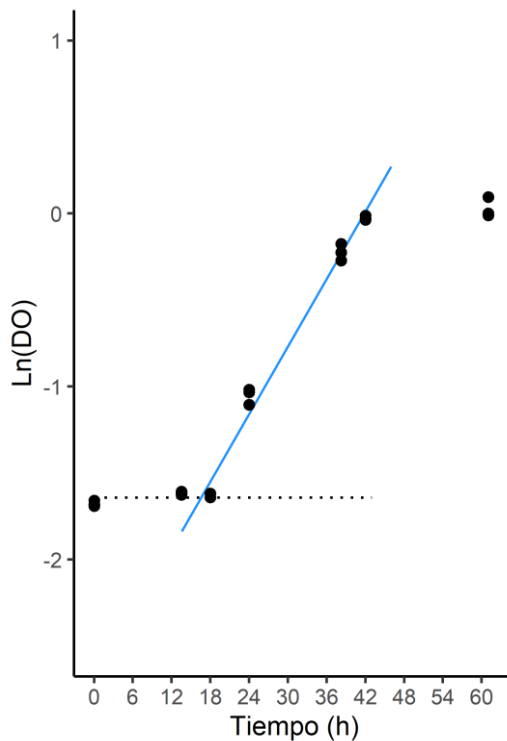


Figura A3.6 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$; Lag = 16,58 h; $R^2_{ajustado} = 0,98$.

ALoCu

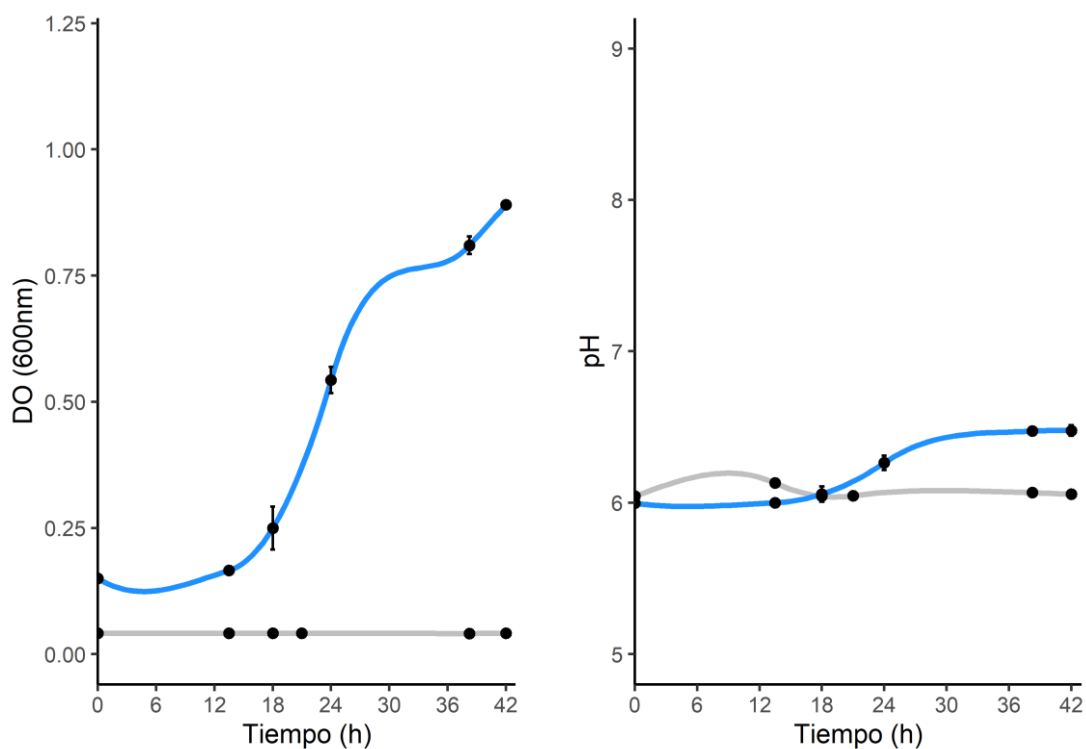


Figura A3.7 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

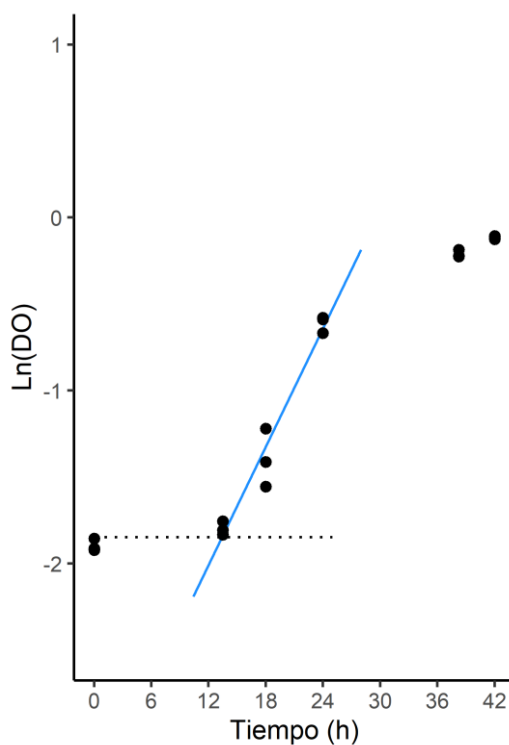


Figura A3.8 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,11 \text{ h}^{-1}$; Lag = 13,42 h; $R^2_{ajustado} = 0,96$.

ALoNi

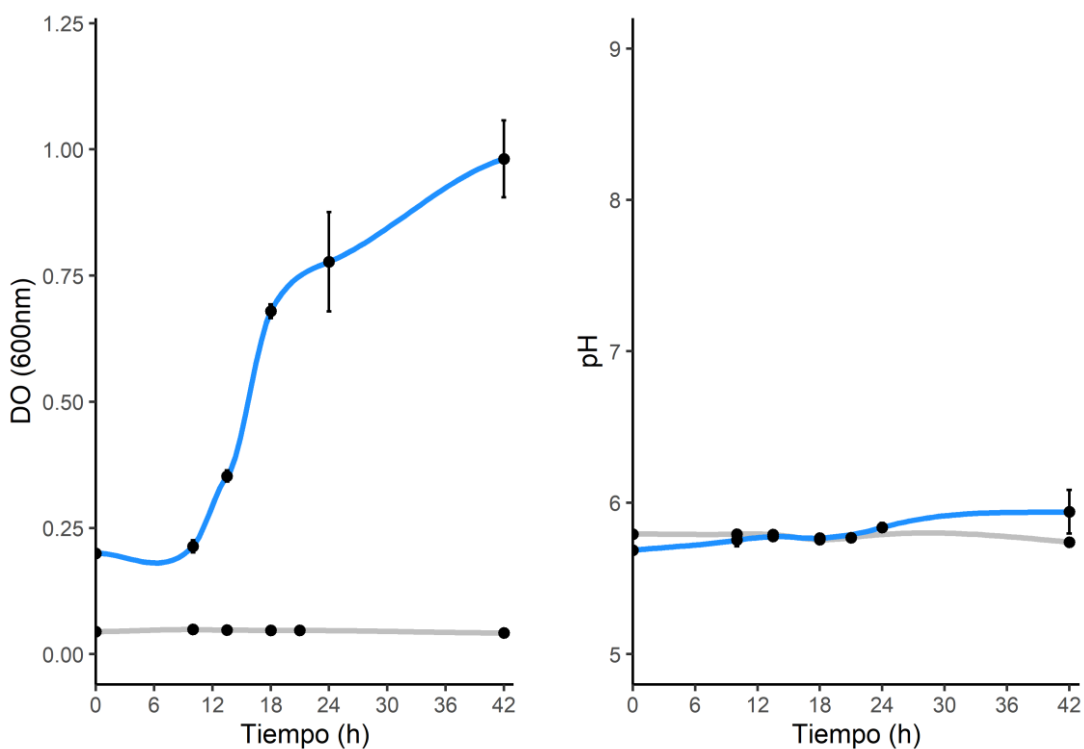


Figura A3.9 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

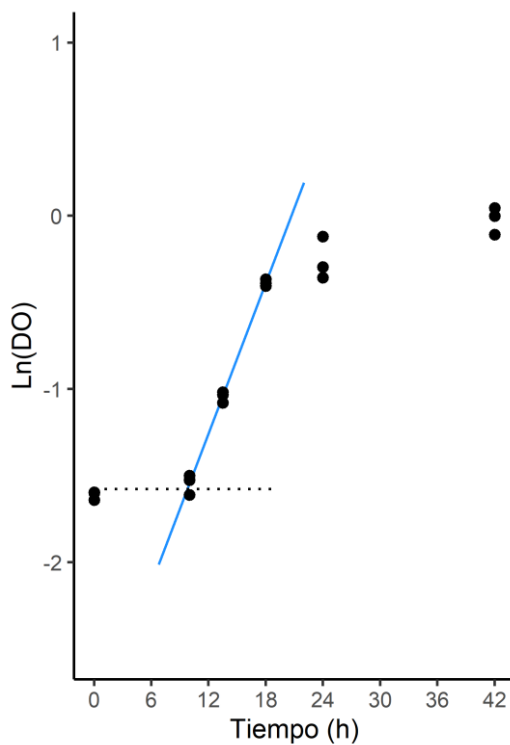


Figura A3.10 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$; Lag = 9,78 h; $R^2_{ajustado} = 0,99$.

ALoZn

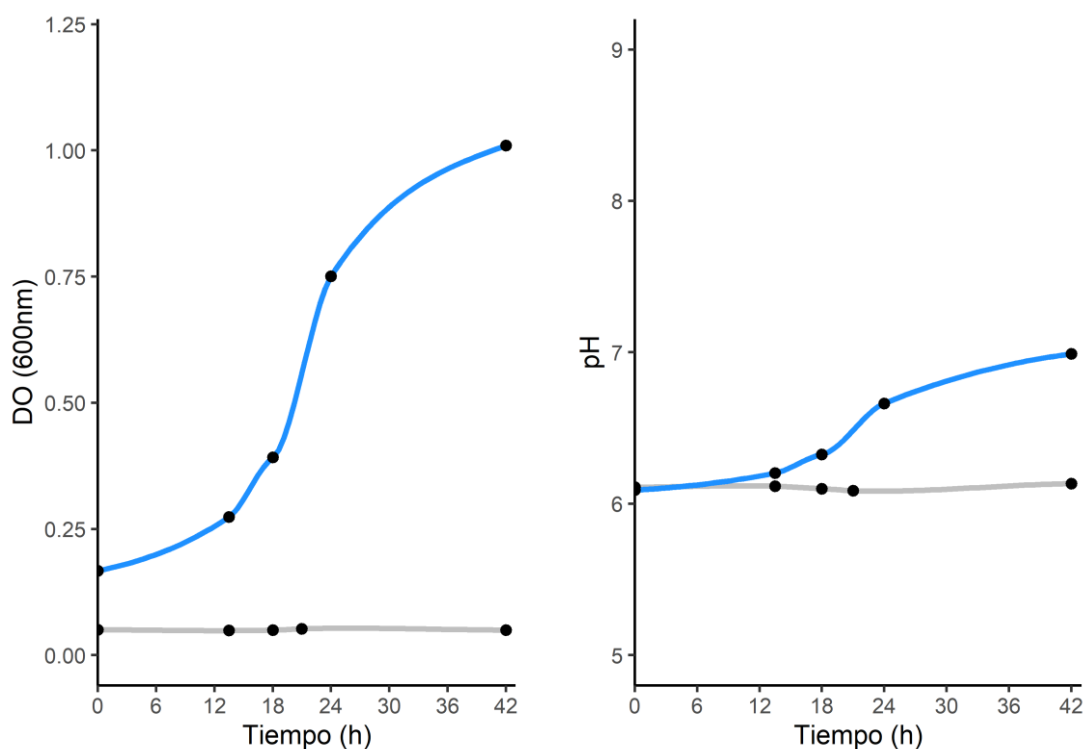


Figura A3.11 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

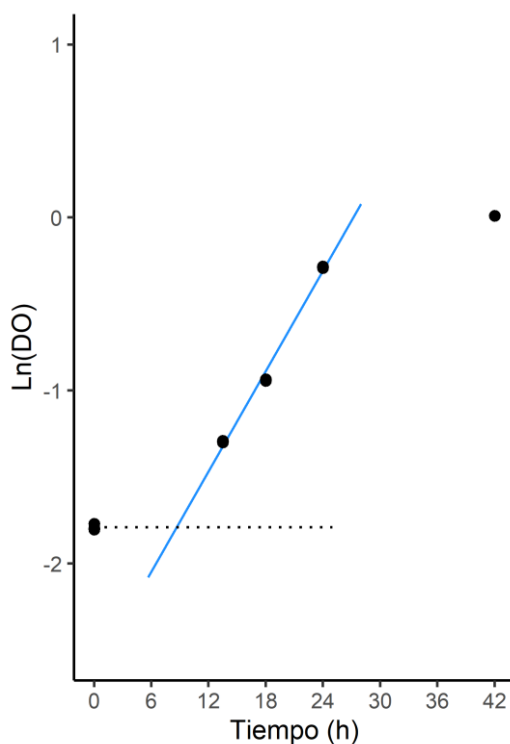


Figura A3.12 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$; Lag = 8,67 h; $R^2_{ajustado} = 0,99$.

SAoSM

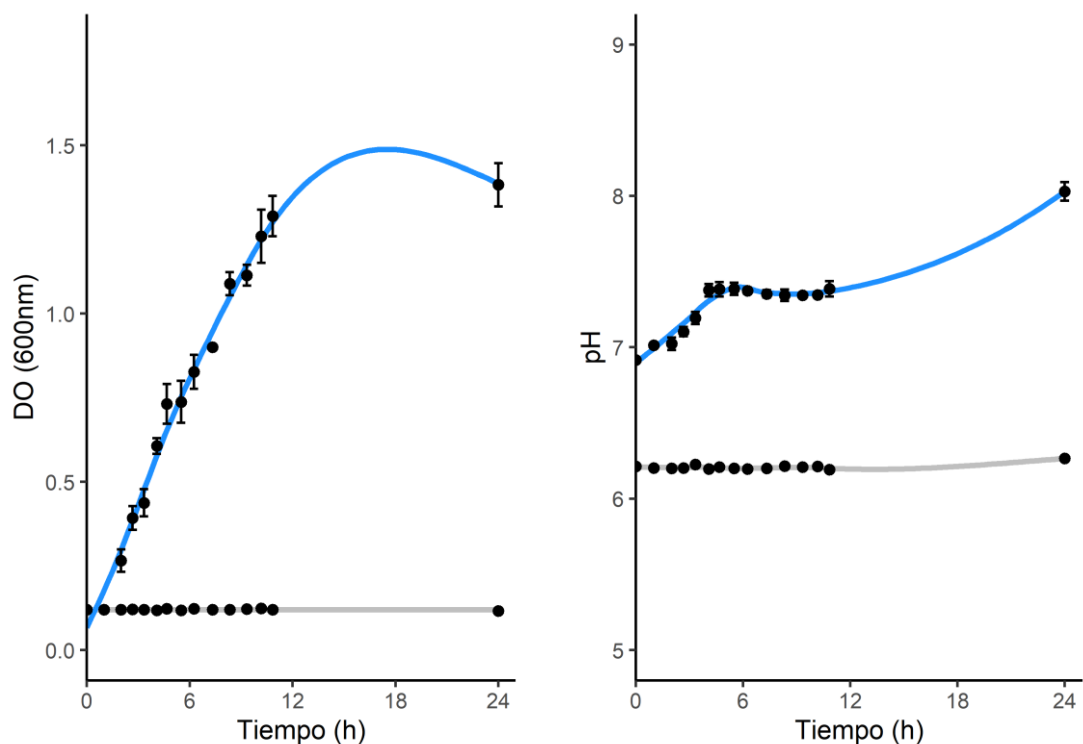


Figura A3.13 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

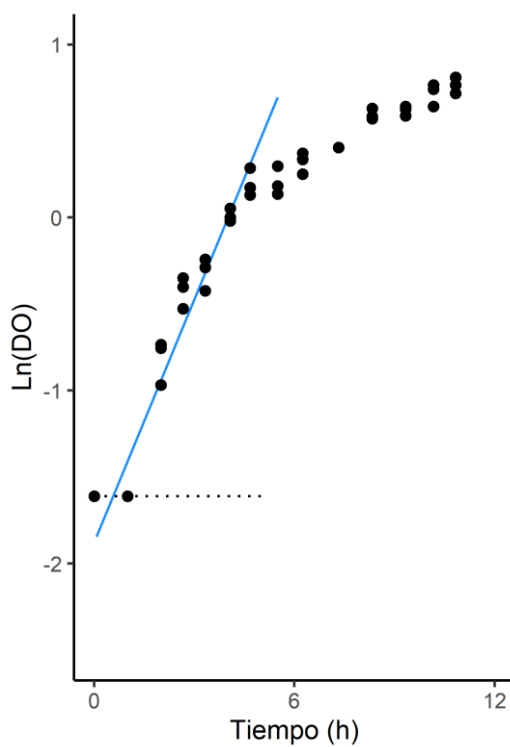


Figura A3.14 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,47 \text{ h}^{-1}$; Lag = 0,58 h; $R^2_{ajustado} = 0,93$.

SAoCd

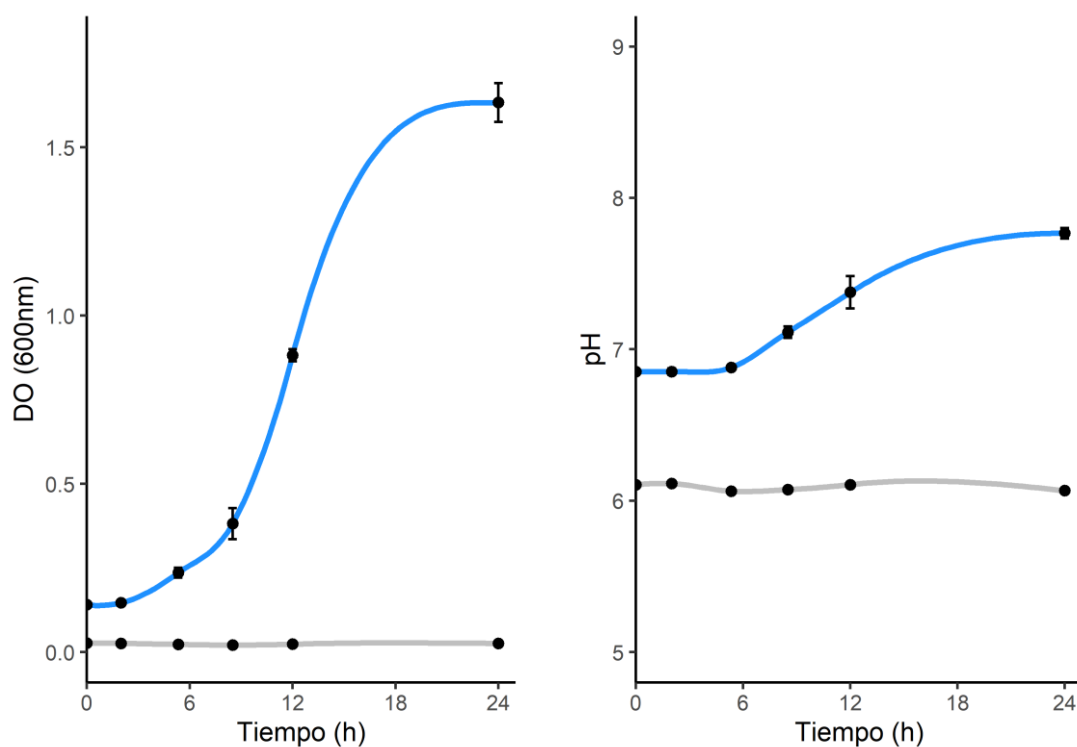


Figura A3.15 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

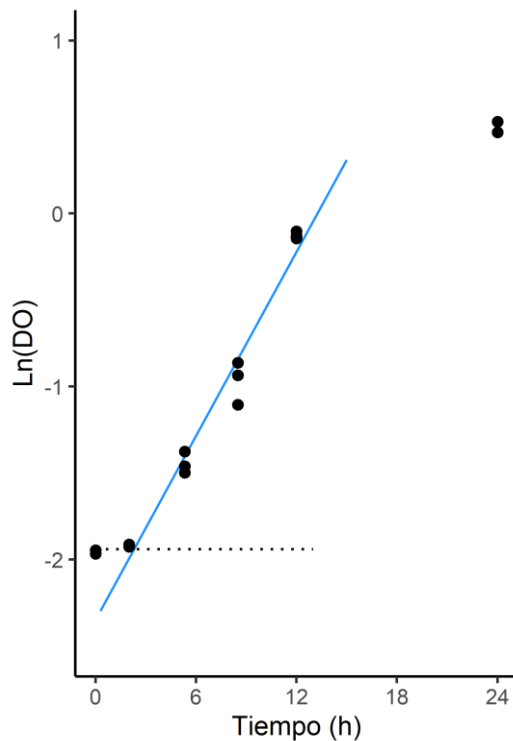


Figura A3.16 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,18 \text{ h}^{-1}$; Lag = 2,29 h; $R^2_{ajustado} = 0,97$.

SAoCo

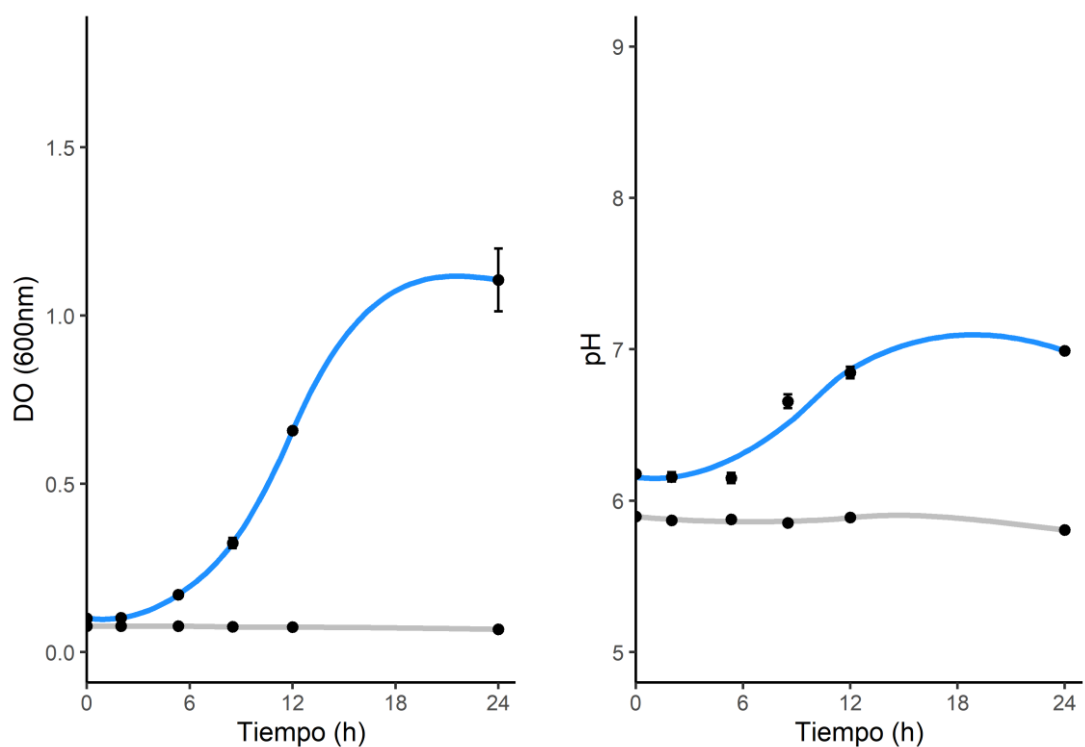


Figura A3.17 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

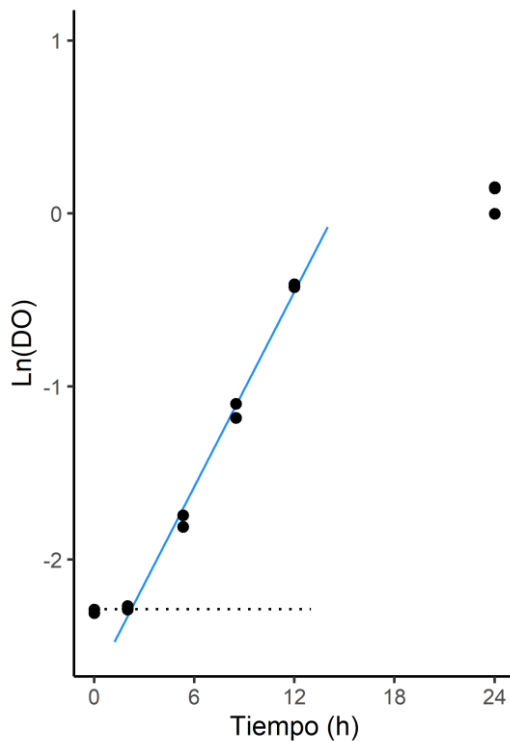


Figura A3.18 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,19 \text{ h}^{-1}$; Lag = 2,21 h; $R2_{ajustado} = 0,99$.

SAoCu

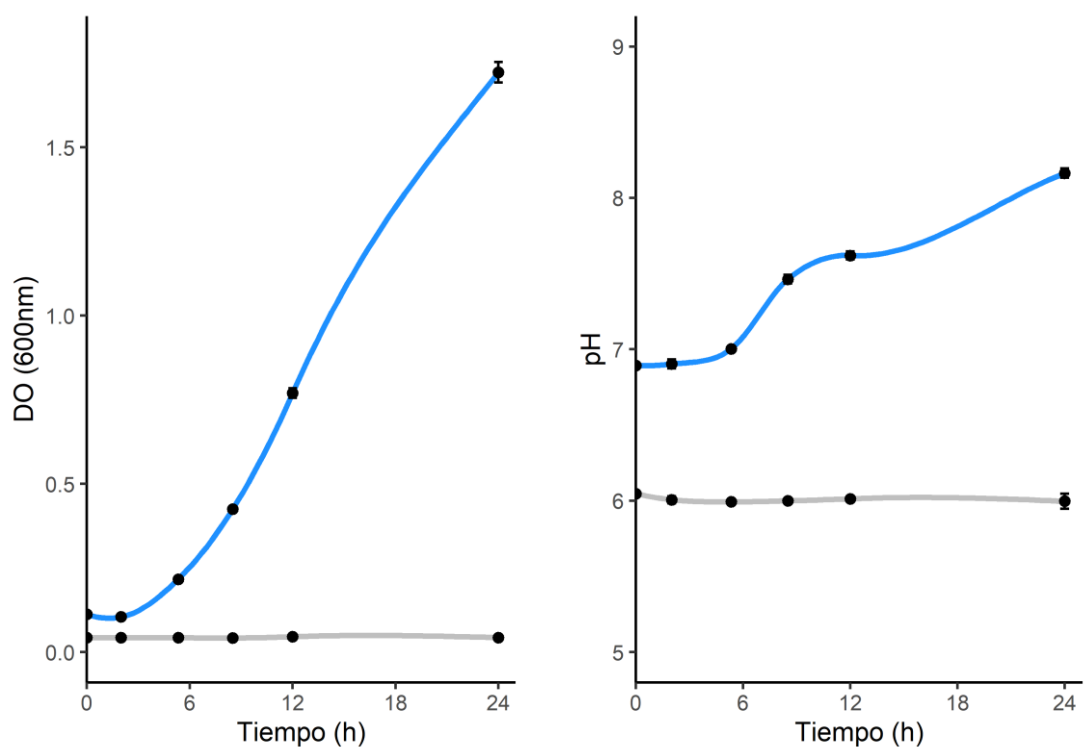


Figura A3.19 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

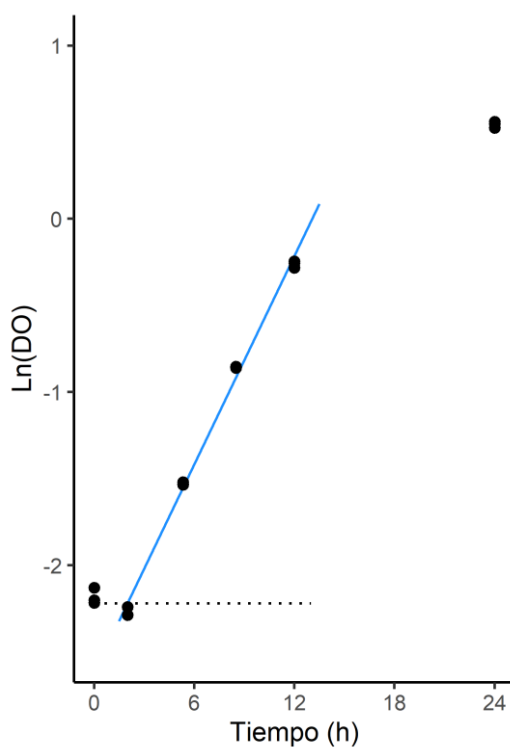


Figura A3.20 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$; Lag = 1,99 h; $R^2_{ajustado} = 0,99$.

SAoNi

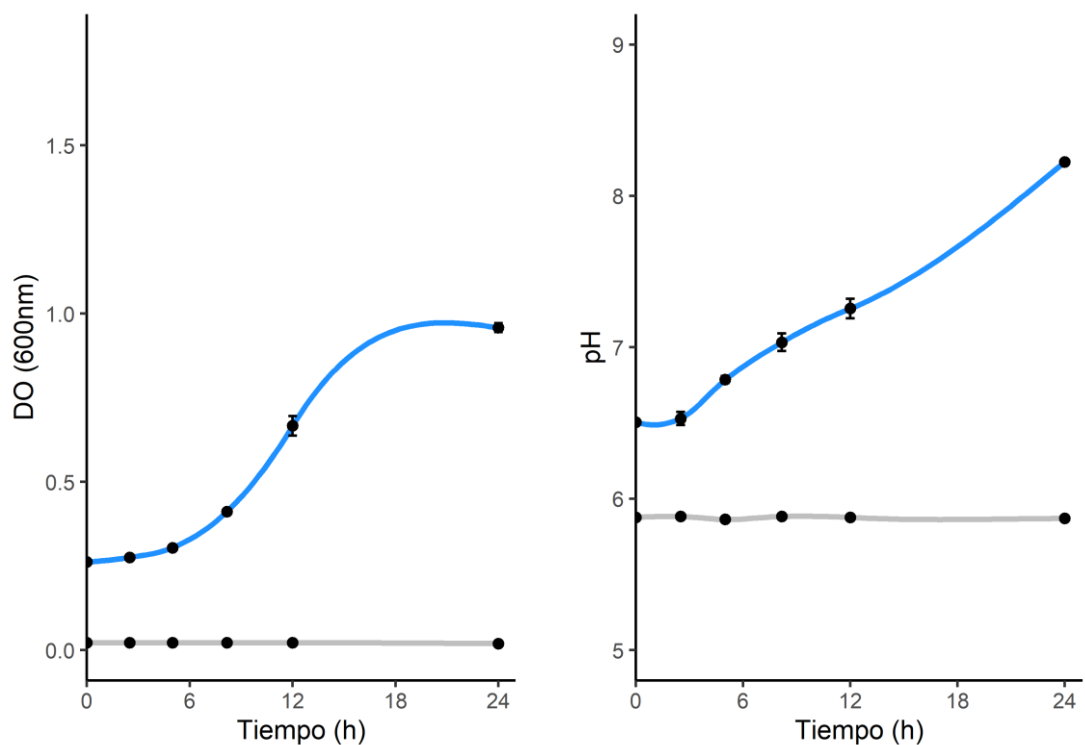


Figura A3.21 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

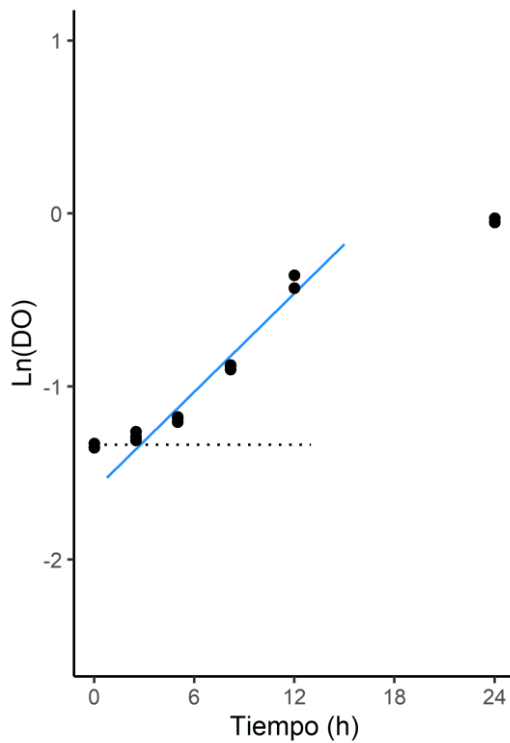


Figura A3.22 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,09 \text{ h}^{-1}$; Lag = 2,75 h; $R^2_{ajustado} = 0,96$.

SAoZn

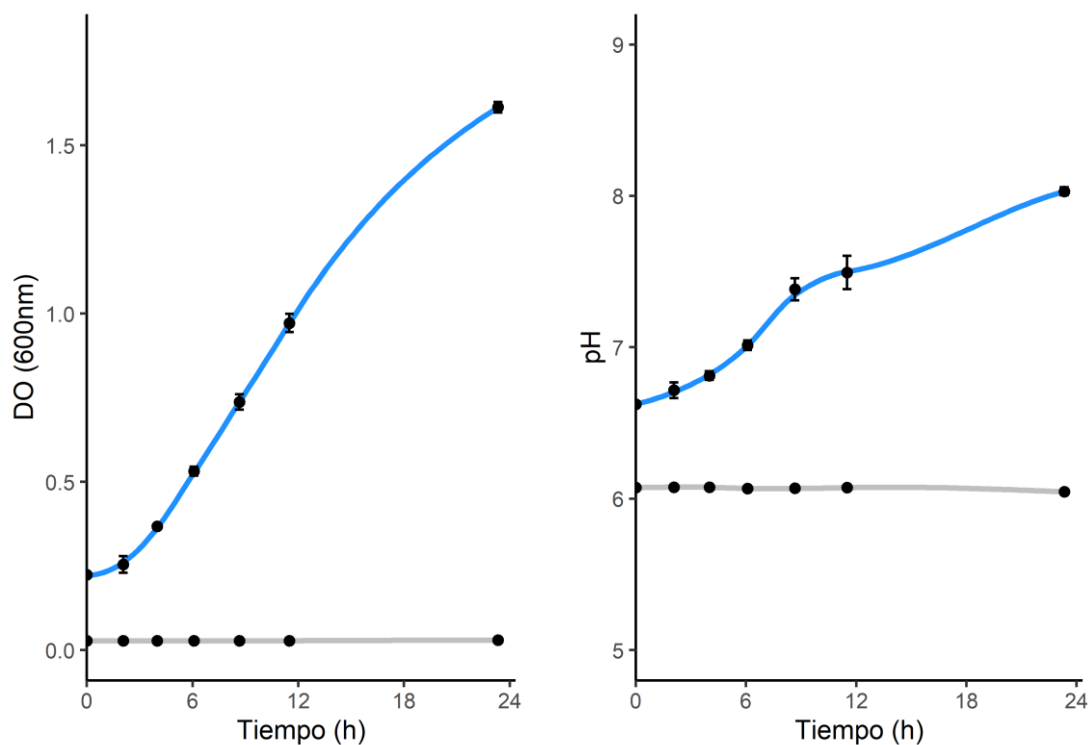


Figura A3.23 – Determinaciones realizadas. Variación de DO (600 nm) y pH.

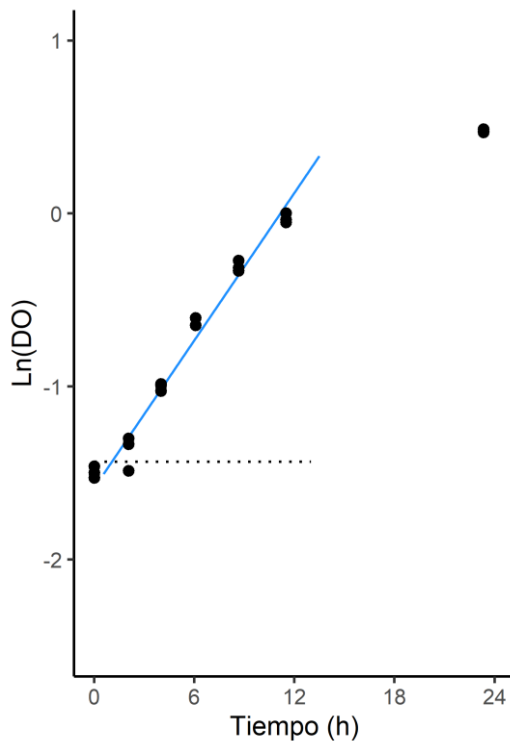
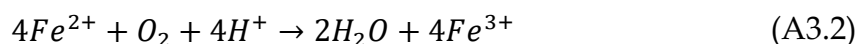


Figura A3.24 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,14 \text{ h}^{-1}$; Lag = 1,07 h; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,97$.

Consortios litótrofos (acidófilos)

En los consorcios litótrofos bajo condiciones acidófilas se determinó la variación en la concentración de Fe(II) y en la concentración de protones y, en el caso de los consorcios provenientes de SA, en la concentración de células.

El metabolismo hierro-oxidante se describe con la **ecuación A3.2**:

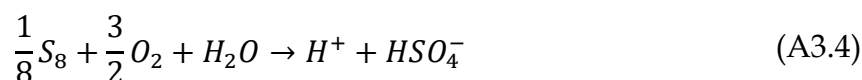


El consumo de un sustrato (en este caso Fe(II)) puede relacionarse con la velocidad de crecimiento de acuerdo con las ecuaciones de Pirt (1965) según la **ecuación (A3.3)**:

$$Fe(II)_0 - Fe(II) = Ke^{\mu t} - K \quad (A3.3)$$

Donde K es una constante vinculada a la concentración de células inicial (X_0) y al rendimiento del crecimiento basado en hierro ($Y_{x/s}$). Esta ecuación fue modelada utilizando el paquete nls de R (Baty *et al.*, 2015) para modelados iterativos de funciones no lineales; de esta manera, se estimó la velocidad de crecimiento específica máxima ($\mu_{M\acute{a}x}$) de cada consorcio hierro-oxidante.

El metabolismo azufre-oxidante se describe con la **ecuación A3.4**:



En este caso, se determinó la generación de protones a través de la variación del pH ($pH = -\log([H^+])$). El modelo utilizado (a partir de las ecuaciones de Pirt para la generación de producto) para estimar la velocidad de crecimiento bajo este metabolismo fue el siguiente (**ec. A3.5**):

$$[H] - [H]_0 = Ke^{\mu t} - K \quad (A3.5)$$

Similar al metabolismo hierro-oxidante, el modelado se realizó utilizando el paquete nls de R.

La concentración de células en los consorcios de Salto del Agrio fue determinada utilizando cámaras de recuento para microscopía óptica. En estos casos, la velocidad de crecimiento (μ) se calcula a partir del valor de la pendiente

de la **ecuación A3.6**, la cual es una recta durante la fase exponencial de crecimiento.

$$\text{Ln}(X) = \text{Ln}(X_o) + \mu t \quad (\text{A3.6})$$

La **Tabla A3.2** resume los parámetros determinados. Además del valor de la velocidad de crecimiento para cada metabolismo, se indica el tiempo al que la concentración de Fe(II) en solución fue cero, y, en el caso del metabolismo azufre-oxidante, el tiempo transcurrido hasta que el pH alcanzó el valor 1 (tF). En estos dos metabolismos, se reporta también el número de iteraciones que fueron necesarias para alcanzar la convergencia en la solución durante el modelado (Iter): un valor entre 1-10 implica un muy buen ajuste, entre 10-20 un ajuste bueno o moderado y un número entre 20-50 significa que la cantidad de datos experimentales aportados está en el límite de lo necesario para la complejidad del modelo; más de 50 iteraciones no aseguran convergencia de los parámetros estimados, por lo que el ajuste no es bueno (Baty *et al.*, 2015).

Tabla A3.2 – Parámetros de crecimiento de consorcios litótrofos acidófilos

Consortio	Generación de H ⁺			Consumo de Fe(II)			[Células/mL]		
	tF (h)	μ (h ⁻¹)	I _{ter}	tF (h)	μ (h ⁻¹)	I _{ter}	Lag(h)	μ (h ⁻¹)	R ² _{adj}
SAaSM	-	-	-	ND	0,013	12	3,42	0,031	0,97
SAaCd	-	-	-	168,0	0,008	15	5,86	0,055	0,98
SAaCo	-	-	-	-	-	-	3,20	0,056	0,90
SAaCu	-	-	-	-	-	-	4,76	0,054	0,98
SAaNi	-	-	-	-	-	-	8,60	0,031	0,96
SAaZn	-	-	-	98,0	0,086	6	3,12	0,114	0,93
ALaSM	265,0	0,009	8	24,0	0,070	5	ND	ND	ND
ALaCd	119,5	0,008	8	120,0	0,025	11	ND	ND	ND
ALaCo	125,0	0,010	7	-	-	-	ND	ND	ND
ALaCu	184,0	0,001	8	71,5	0,061	10	ND	ND	ND
ALaNi	142,5	0,013	6	48,0	0,047	8	ND	ND	ND
ALaZn	-	-	-	28,5	0,040	6	ND	ND	ND

*Los guiones (-) indican que no se observó variación en el parámetro a lo largo de la cinética. ND indica que no se determinó ese parámetro en el ensayo.

Todas las cinéticas fueron realizadas por triplicado. Los gráficos fueron realizados utilizando el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) en R. Se muestra el promedio de los triplicados y las barras de error correspondiente, las curvas que conectan los puntos tienen una finalidad representativa. En las determinaciones realizadas se presenta en azul los cultivos inoculados y en gris los controles abióticos. En los ajustes a modelos teóricos se presenta en azul la predicción del modelo y en negro los datos experimentales. Todos las representaciones de un mismo parámetro se muestran con igual escala al eje *y* para facilitar la comparación entre consorcios de un mismo origen.

ALaSM

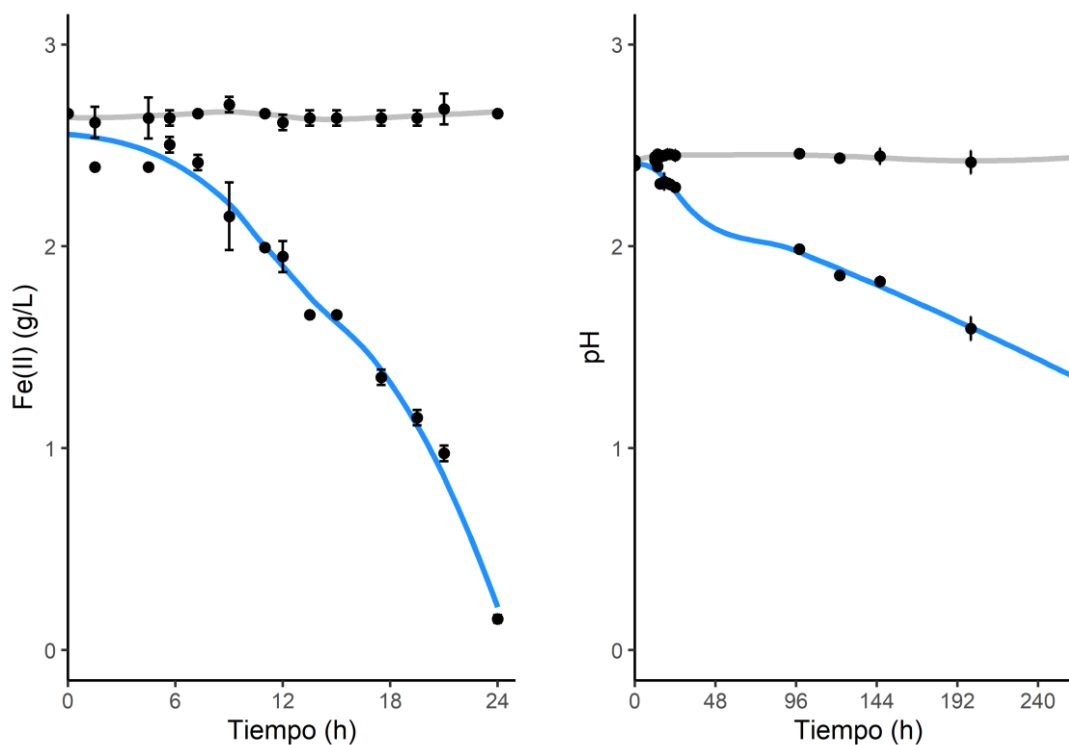


Figura A3.25 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

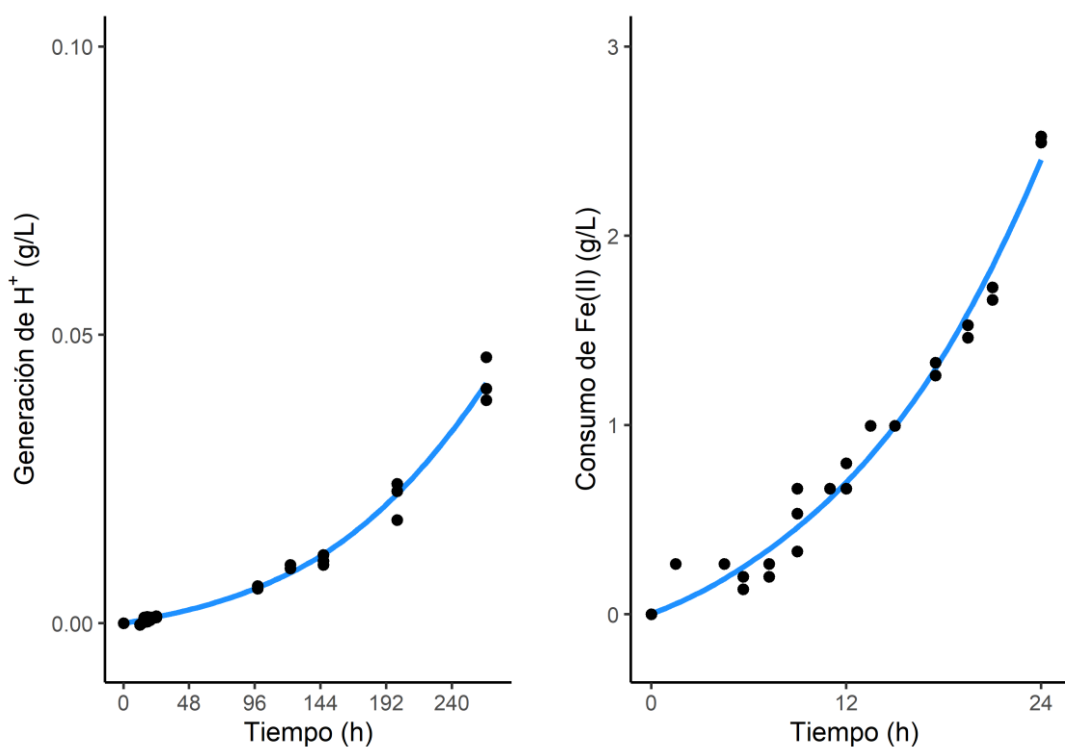


Figura A3.26 – Ajuste a modelos teóricos.

$\mu(\text{Fe}) = 0,070 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 24 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 5.
 $\mu(\text{H}) = 0,009 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/variación de H⁺ = 265 h; Núm. Iteraciones(H) = 8.

ALaCd

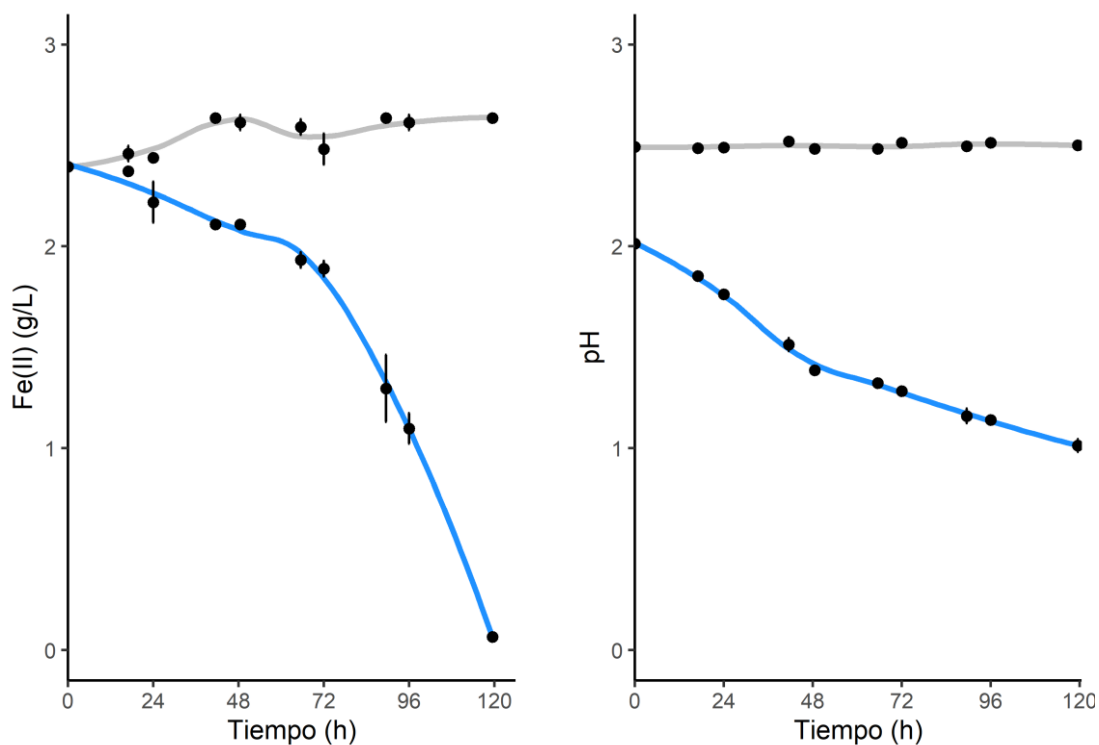


Figura A3.27 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

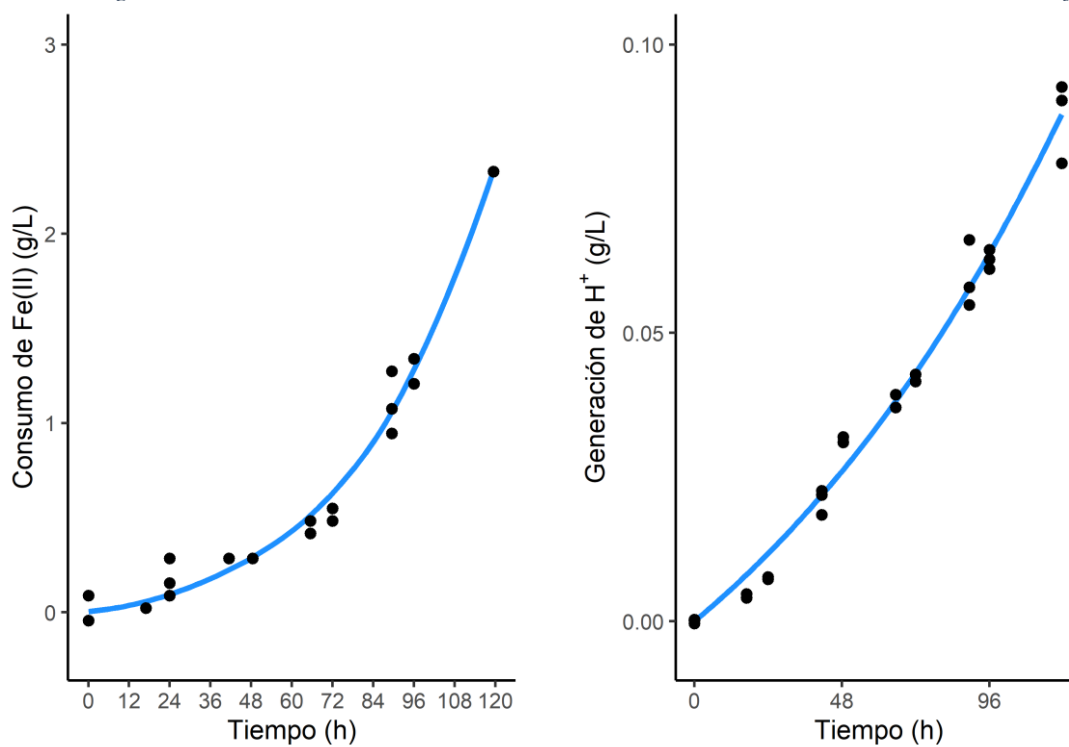


Figura A3.28 – Ajuste a modelos teóricos.

$\mu(\text{Fe}) = 0,025 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 120 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 11.

$\mu(\text{H}) = 0,008 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/variación de H⁺ = 120 h; Núm. Iteraciones(H) = 8.

ALaCo

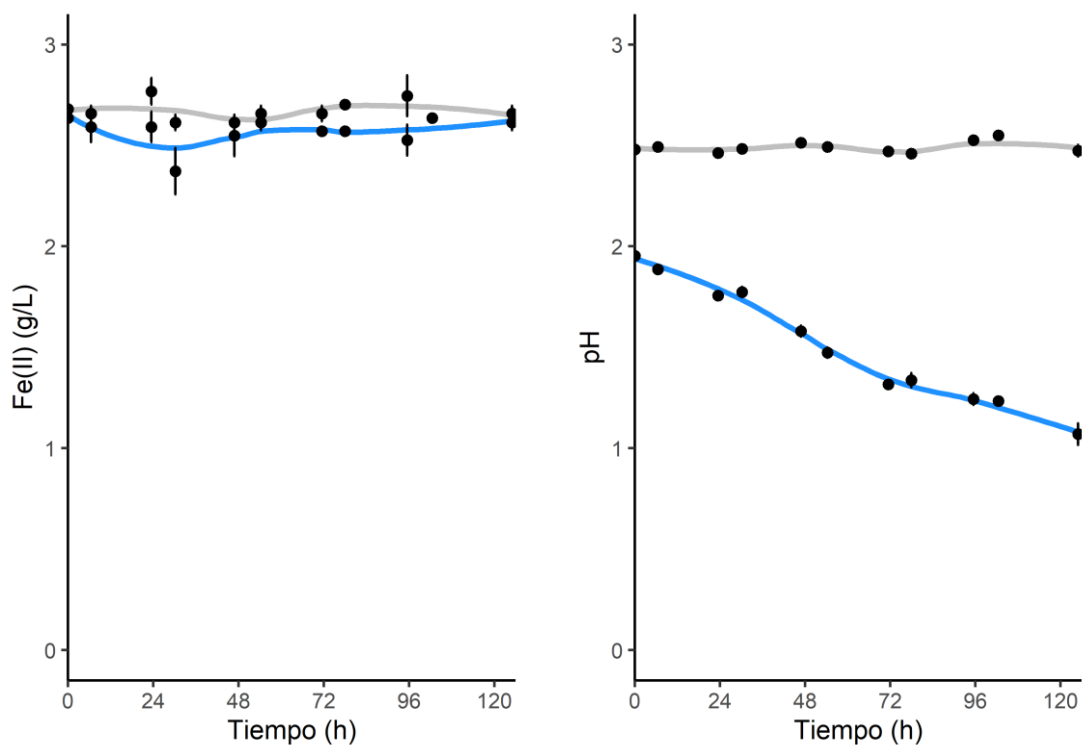


Figura A3.29 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

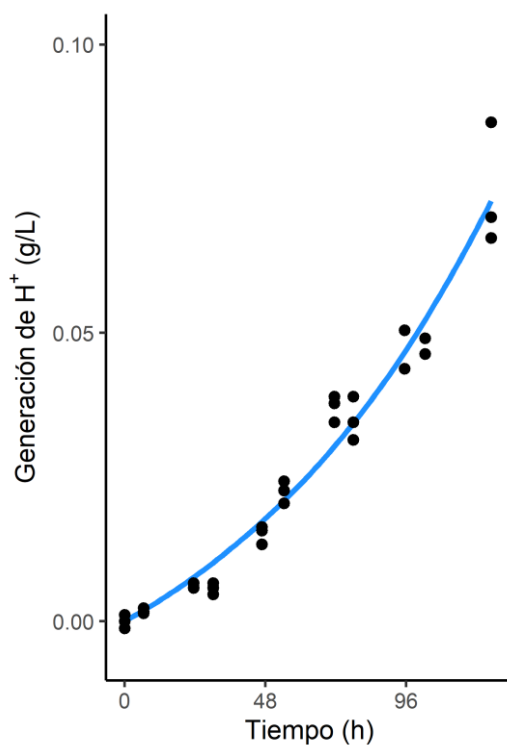


Figura A3.30 – Ajuste a modelos teóricos.
 $\mu(H) = 0,010 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/variación de $H^+ = 125 \text{ h}$; Núm. Iteraciones(H) = 7

ALaCu

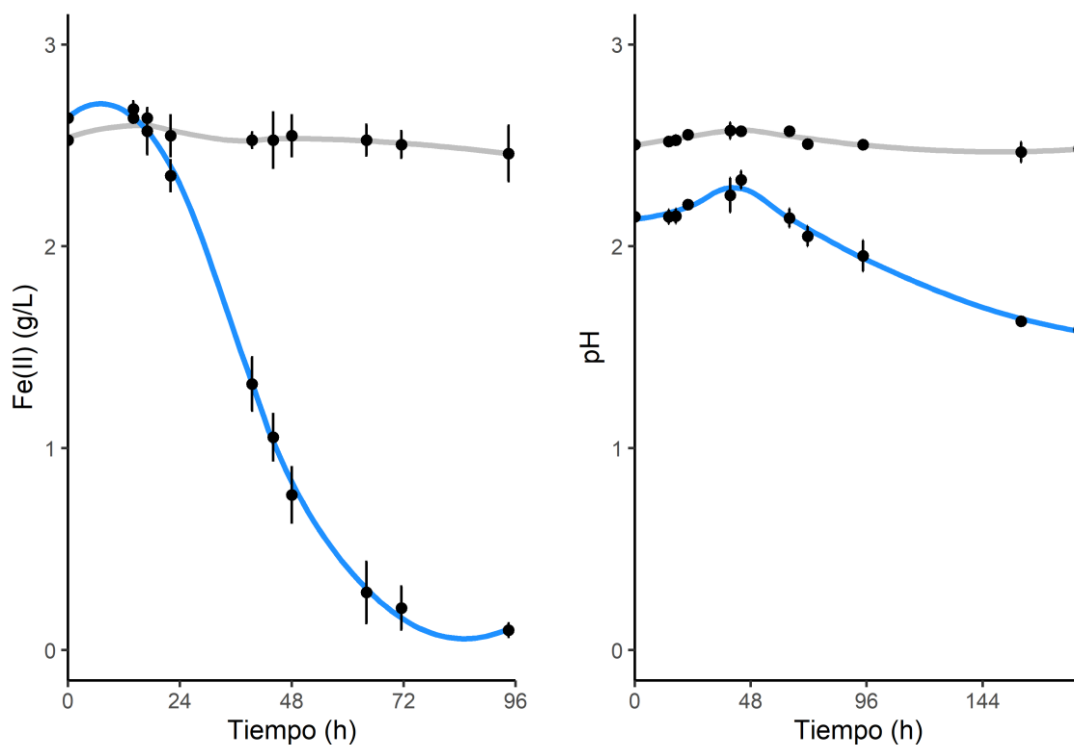


Figura A3.31 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

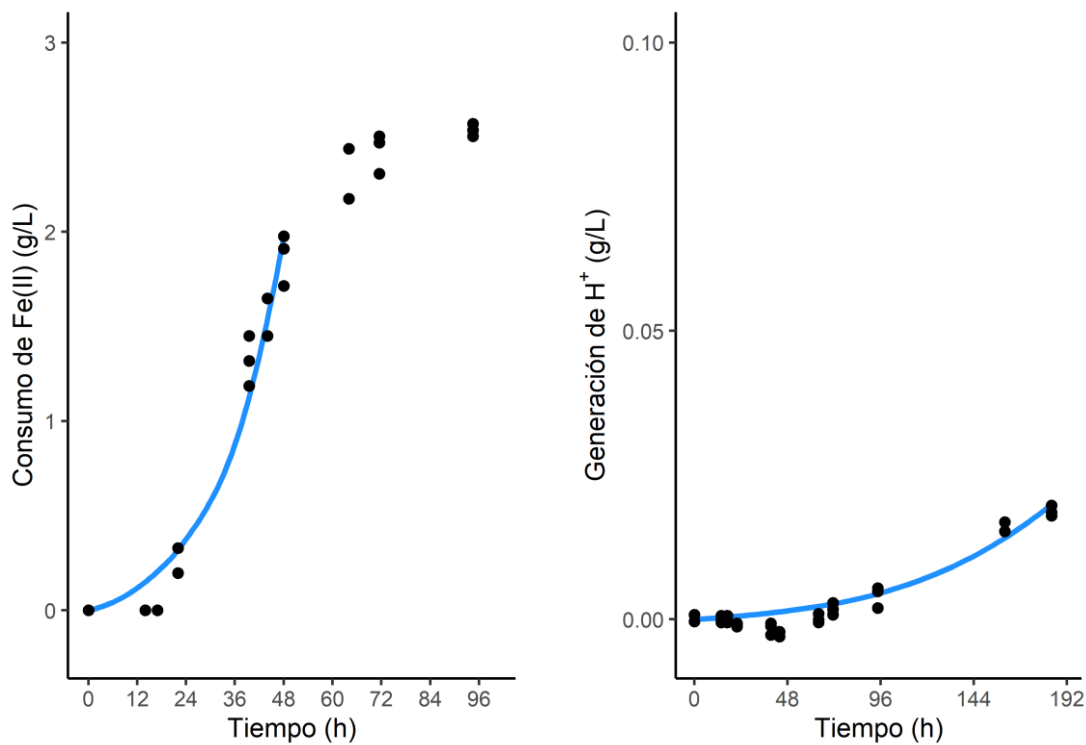


Figura A3.32 – Ajuste a modelos teóricos.

$\mu(\text{Fe}) = 0,061 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 72 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 10.

$\mu(\text{H}) = 0,001 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/variación de H^+ = 184 h; Núm. Iteraciones(H) = 8.

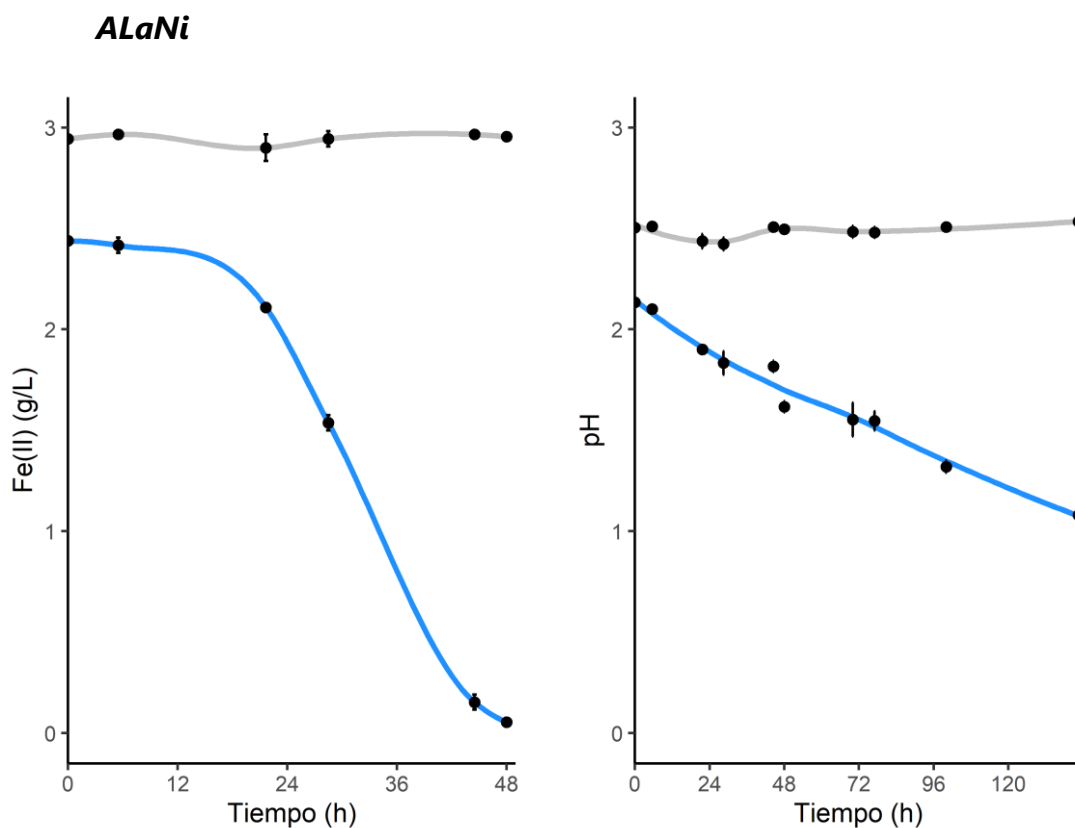


Figura A3.33 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

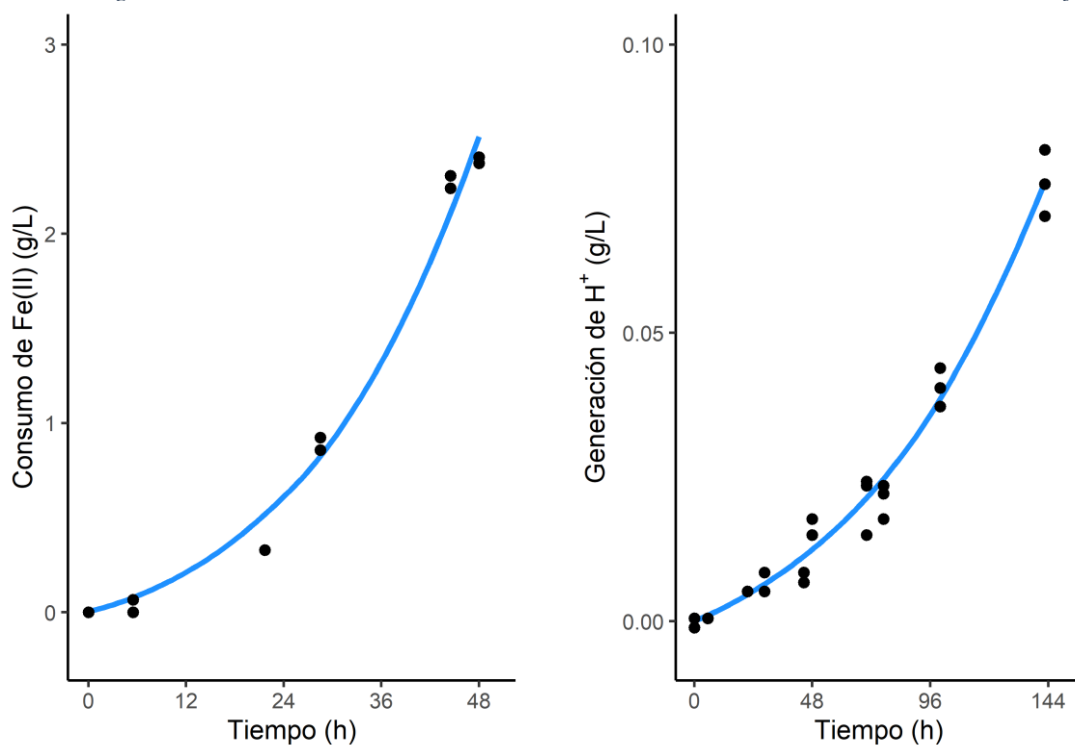


Figura A3.34 – Ajuste a modelos teóricos.

$\mu(\text{Fe}) = 0,047 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 48 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 8.

$\mu(\text{H}) = 0,013 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/variación de H⁺ = 143 h; Núm. Iteraciones(H) = 6.

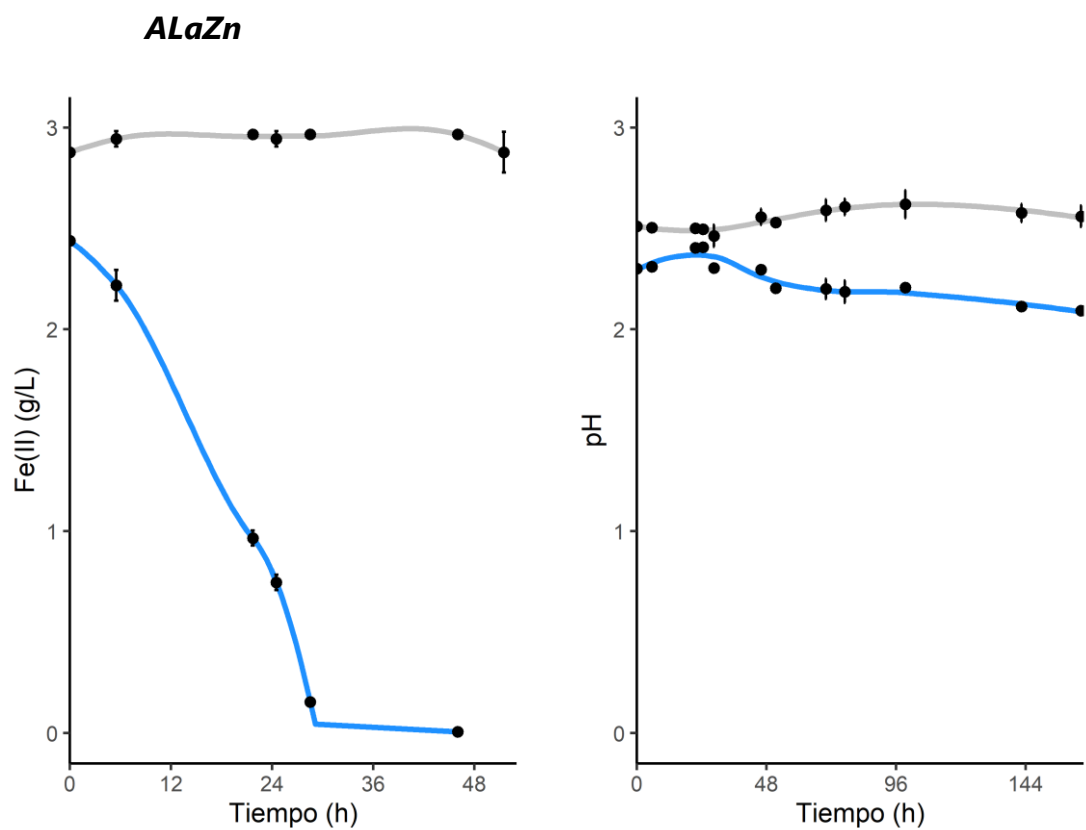


Figura A3.35 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución y pH.

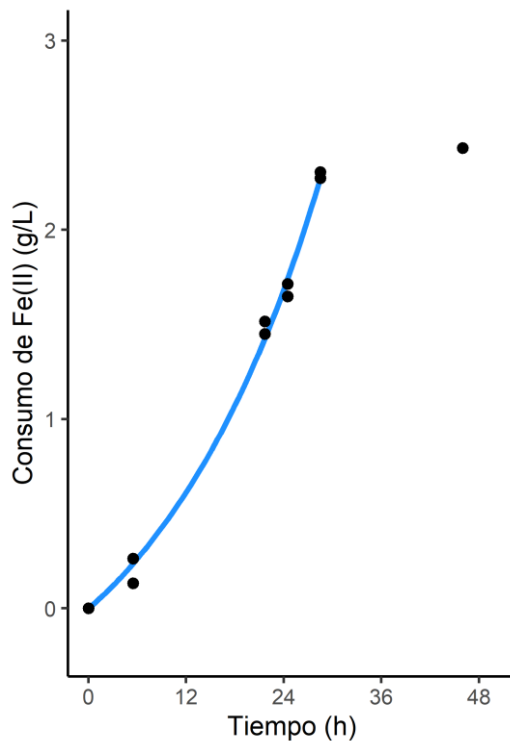


Figura A3.36 – Ajuste a modelos teóricos.
 $\mu(\text{Fe}) = 0,040 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 29 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 6

SAaSM

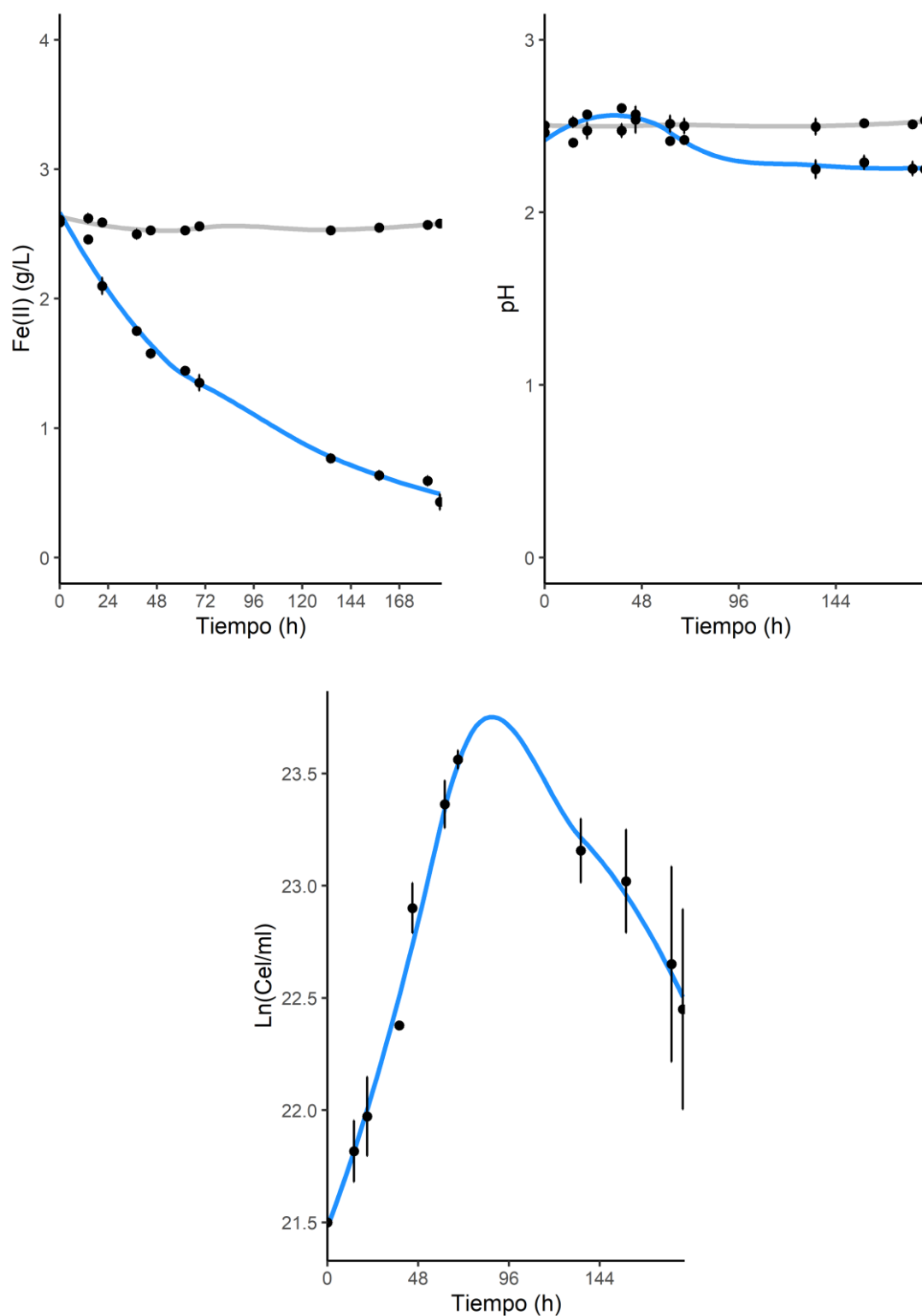


Figura A3.37 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

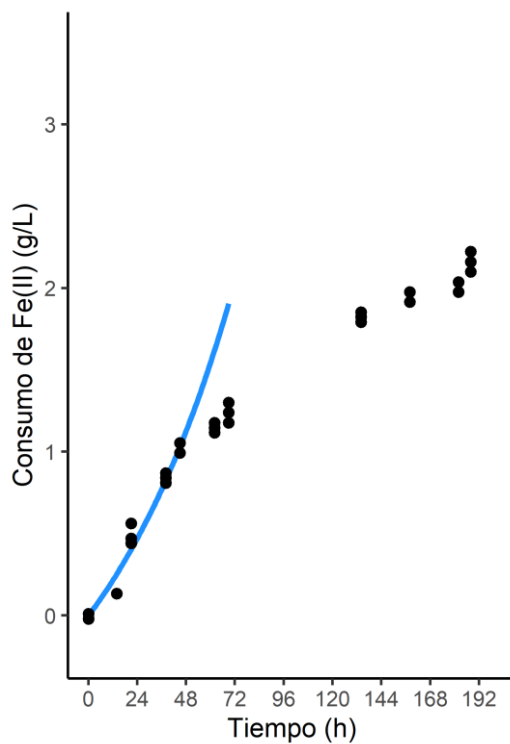


Figura A3.38 – Ajuste a modelo teórico:
 $\mu(\text{Fe}) = 0,013 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = ND; Núm. Iteraciones(Fe) = 12

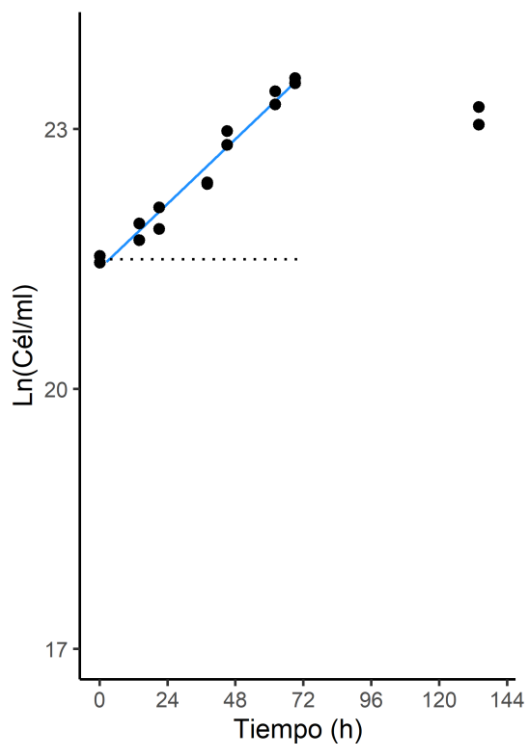


Figura A3.39 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,031 \text{ h}^{-1}$; Lag = 3,42 h; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,97$.

SAaCd

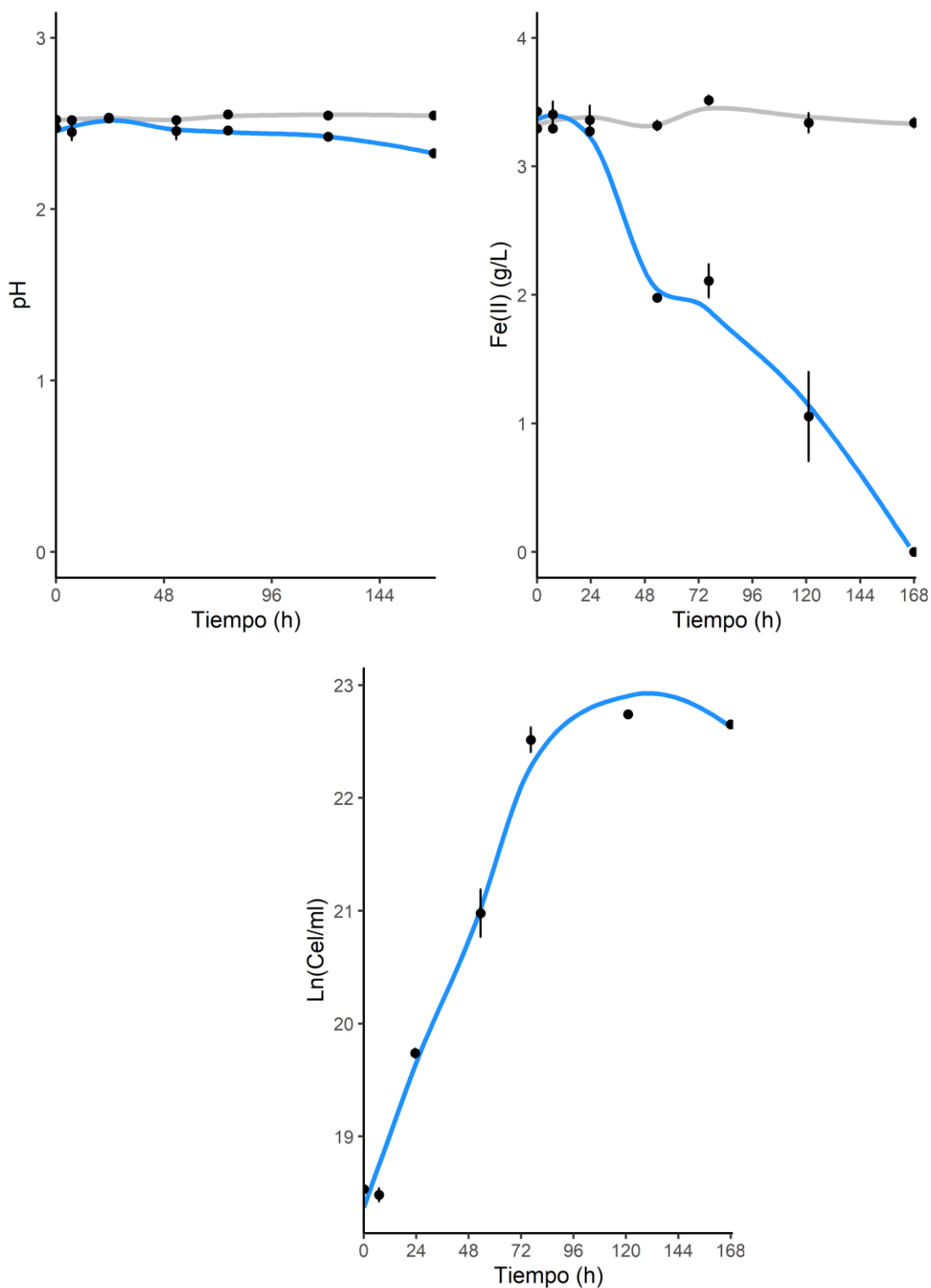


Figura A3.40 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

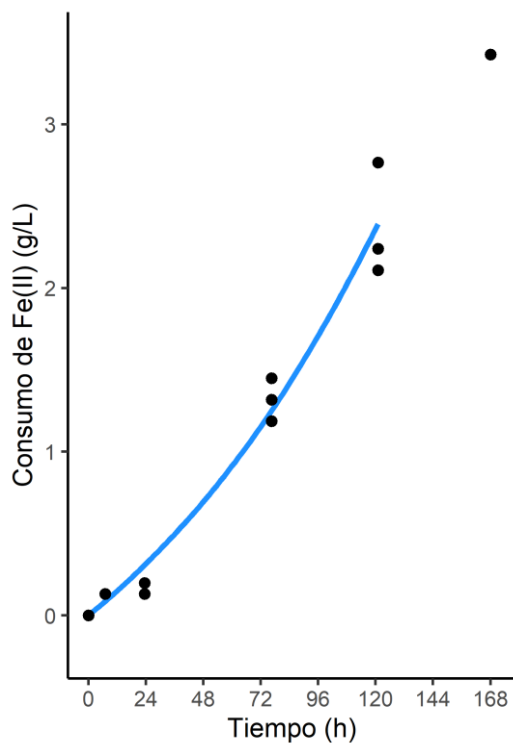


Figura A3.41 – Ajuste a modelo teórico:
 $\mu(\text{Fe}) = 0,008 \text{ h}^{-1}$; Tiempo final p /consumo de Fe(II) = 168 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 15.

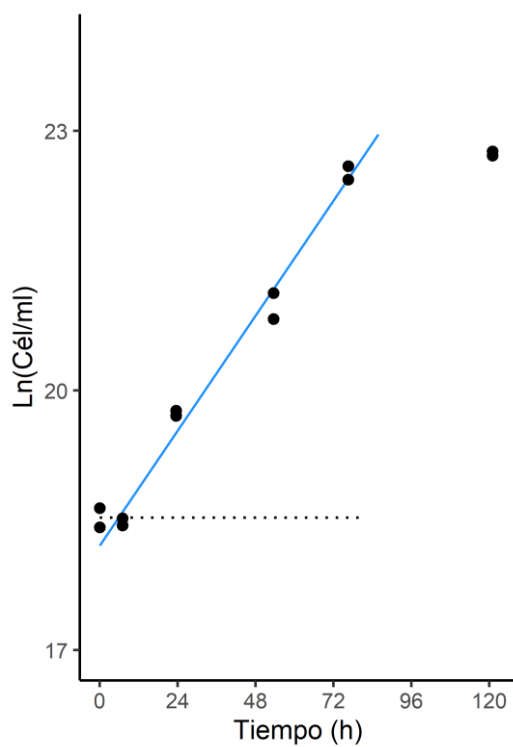


Figura A3.42 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,055 \text{ h}^{-1}$; Lag = 5,86 h; $R^2_{ajustado} = 0,98$.

SAaCo

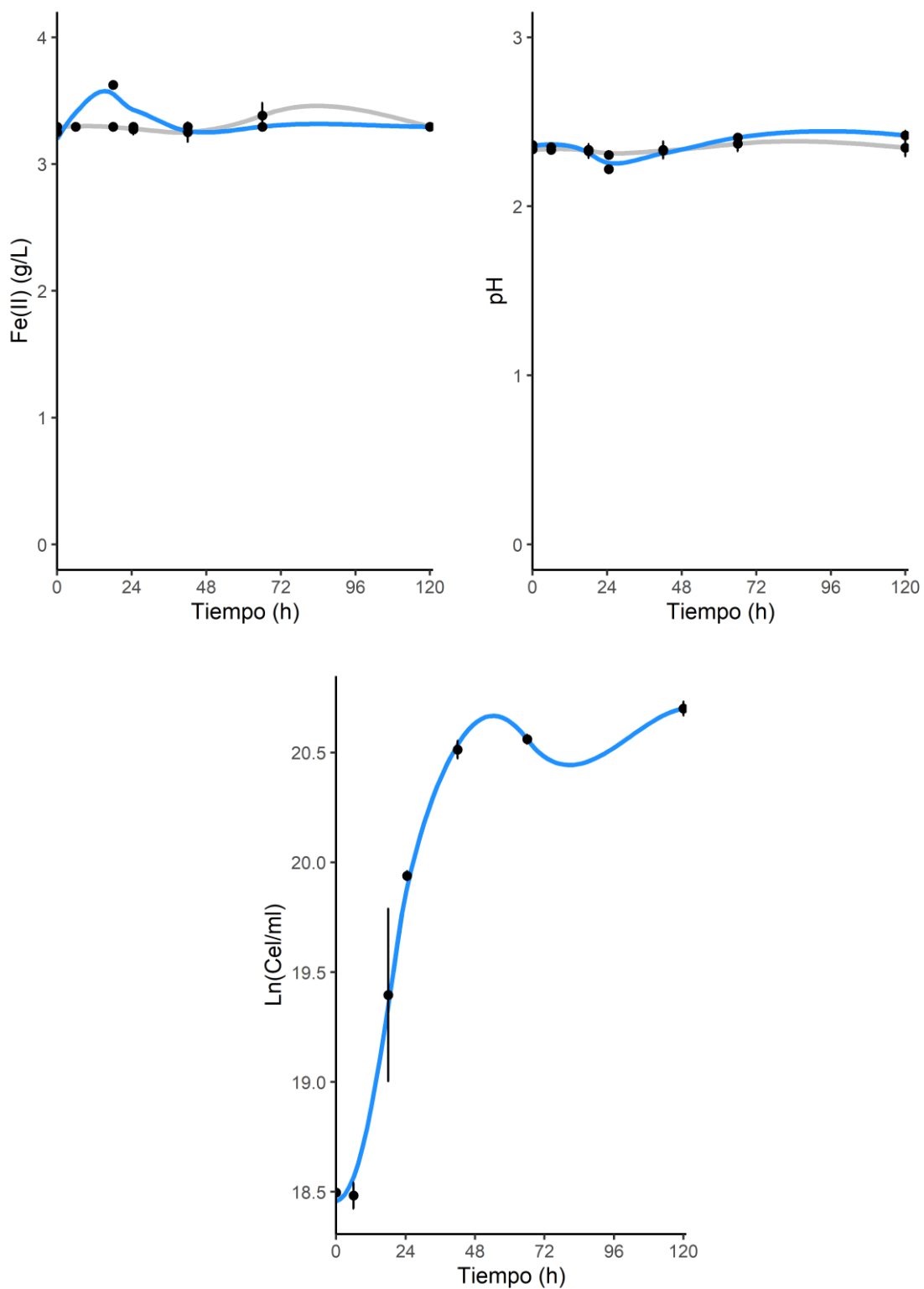


Figura A3.43 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

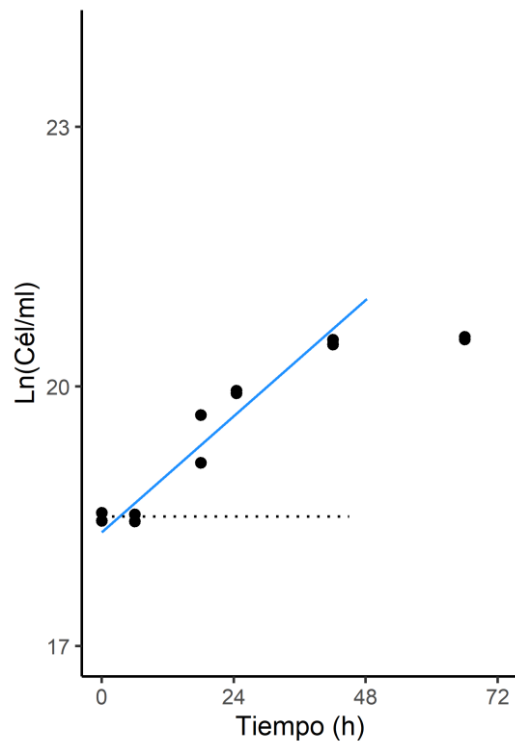


Figura A3.44 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,056 \text{ h}^{-1}$; Lag = 3,20 h; $R^2_{ajustado} = 0,90$.

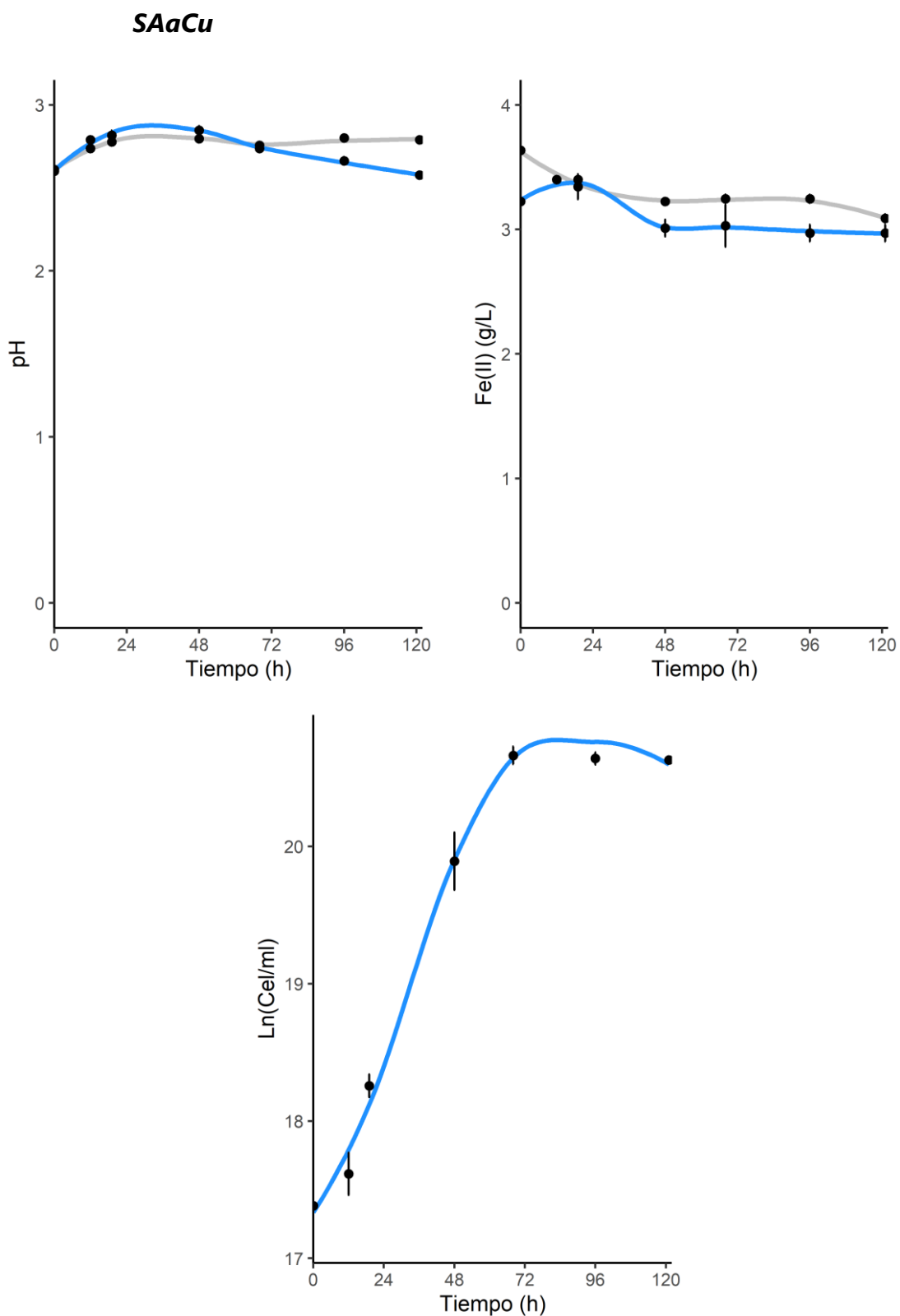


Figura A3.45 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

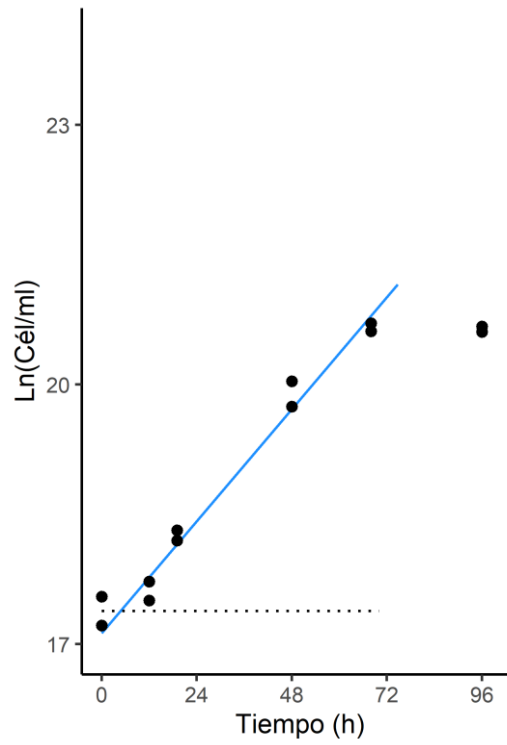


Figura A3.46 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,054 \text{ h}^{-1}$; $\text{Lag} = 4,76 \text{ h}$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0,98$.

SAaNi

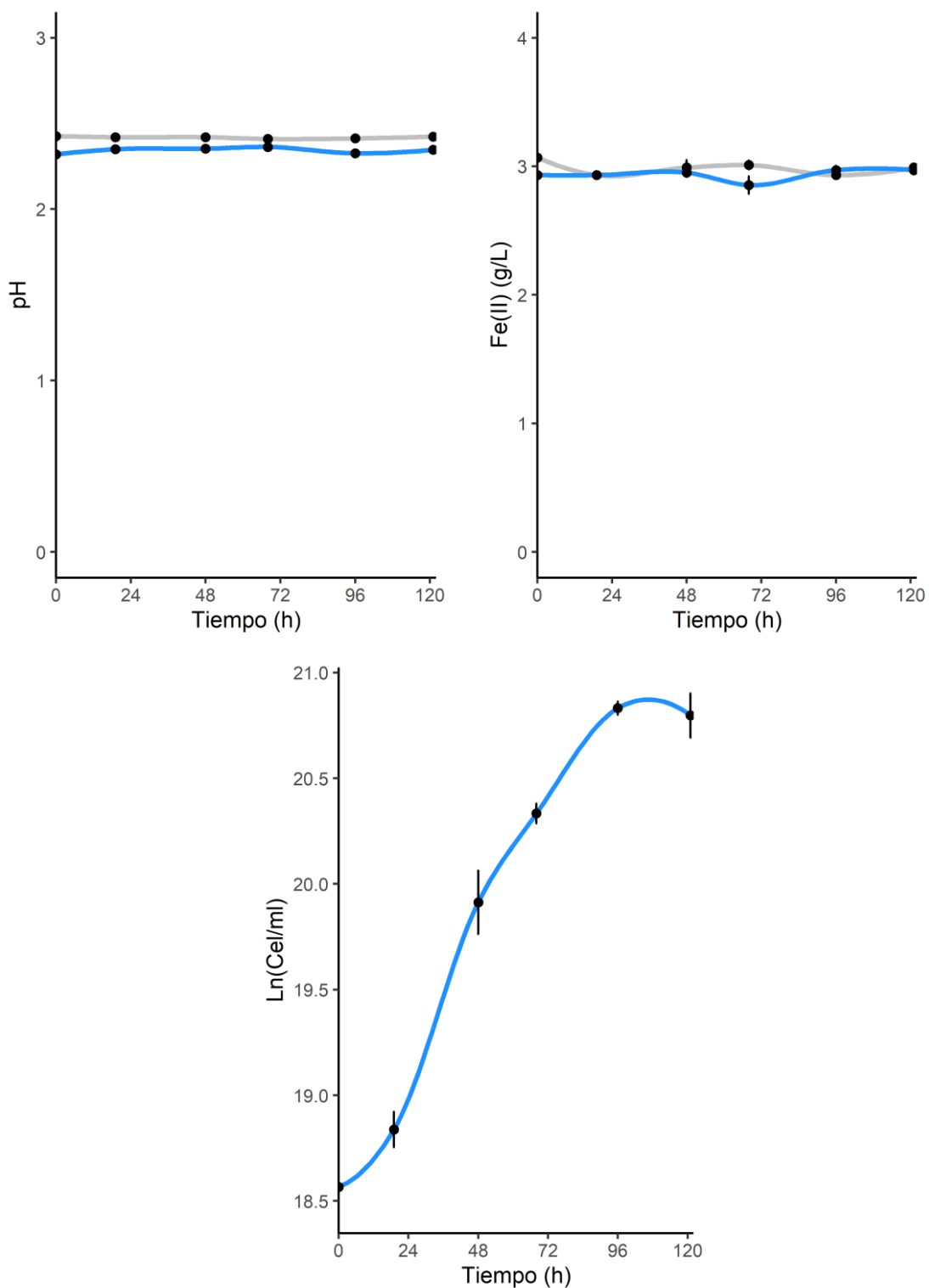


Figura A3.47 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

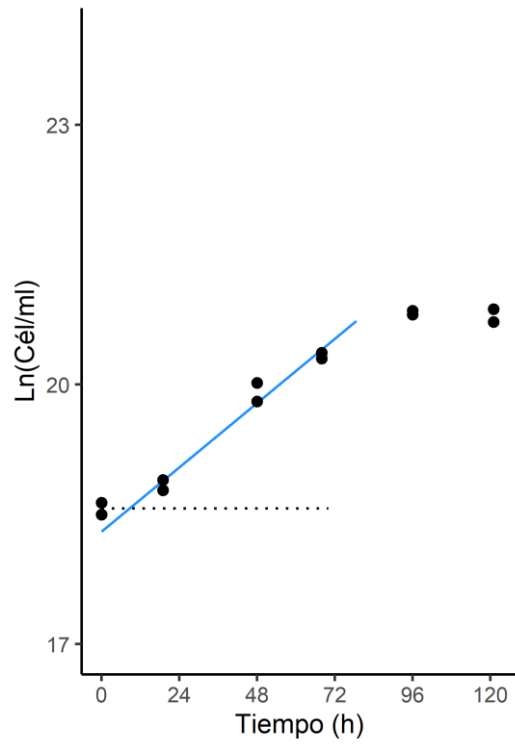


Figura A3.48 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,031 \text{ h}^{-1}$; Lag = 8,60 h; $R^2_{ajustado} = 0,96$.

SAaZn

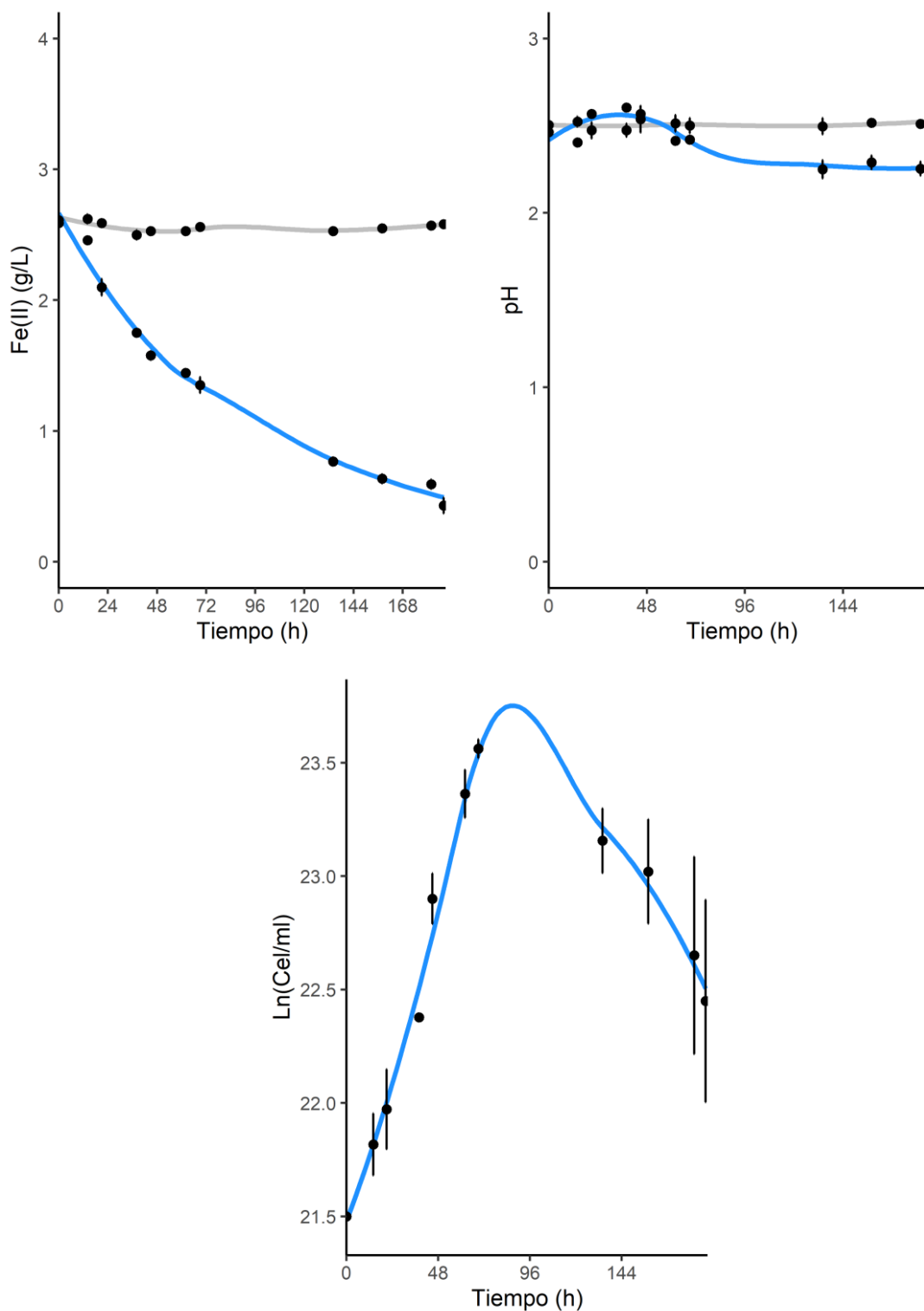


Figura A3.49 – Determinaciones realizadas. Concentración de Fe(II) en solución, pH y recuento de células por microscopía.

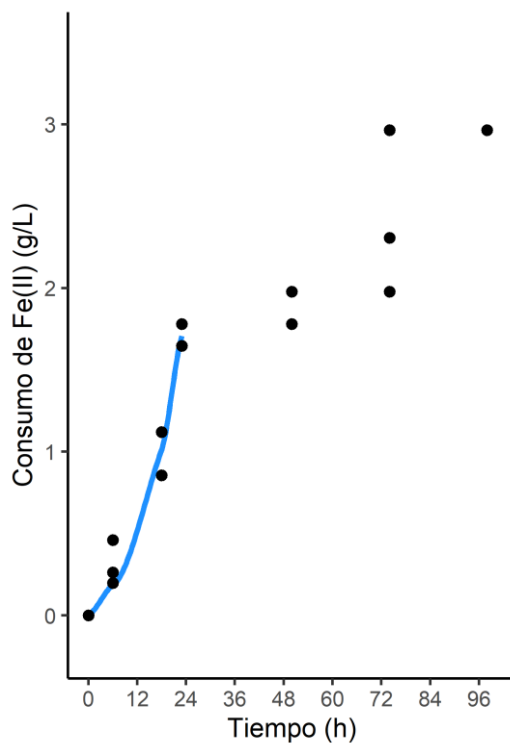


Figura A3.50 – Ajuste a modelo teórico:
 $\mu(Fe) = 0,013 h^{-1}$; Tiempo final p/consumo de Fe(II) = 98 h; Núm. Iteraciones(Fe) = 6.

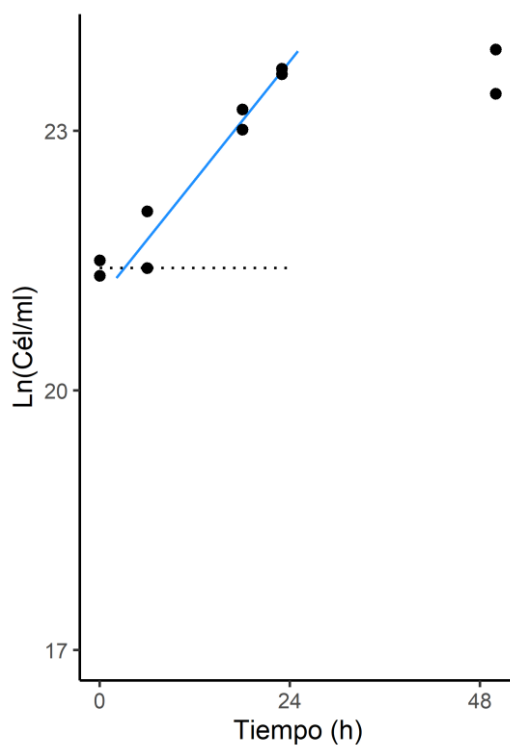


Figura A3.51 – Transformación para la determinación de parámetros. En azul la recta pendiente, en línea punteada la fase de latencia. $\mu = 0,114 h^{-1}$; Lag = 3,12 h; $R^2_{ajustado} = 0,93$.